

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISIANE EMANUELE GRUBER

**ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O VÍRUS ZIKA: OBTENÇÃO E POSSÍVEL  
USO EM DIAGNÓSTICO E TERAPIA**

CURITIBA

2017

GISIANE EMANUELE GRUBER

**ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O VÍRUS ZIKA: OBTENÇÃO E POSSÍVEL  
USO EM DIAGNÓSTICO E TERAPIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
banca avaliadora como requisito parcial para a  
conclusão do Curso de Biomedicina, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Ono  
Co-orientadora: Dra. Camila Zanluca

CURITIBA

2017

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado força nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais e irmã que sempre estiveram dispostos a me ajudar, incentivar e ouvir;

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração;

Às minhas orientadoras Camila Zanluca e Lucy Ono, por terem dedicado seu tempo a este trabalho.

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,  
e os seus planos serão bem-sucedidos.”*

*(Provérbios 16:3)*

## RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus*, possui genoma de RNA fita simples e estrutura similar a outros vírus do gênero *Flavivirus*, como os vírus da dengue e febre amarela. A infecção por ZIKV apresenta sintomas como *rash* cutâneo e febre, sendo os problemas neurológicos, como síndrome de Guillain-Barré e microcefalia, algumas das principais complicações que a infecção pode causar. O ZIKV é transmitido principalmente através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados e seu diagnóstico é baseado na detecção do RNA viral. Atualmente não há vacina ou tratamento específico para a infecção por ZIKV. Anticorpos específicos para ZIKV podem ser uma alternativa para fins terapêuticos e para a obtenção de testes diagnósticos sem reação cruzada com outros flavivírus. Em função disso, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação dos atuais anticorpos desenvolvidos contra ZIKV e seu potencial terapêutico e em diagnósticos através da revisão bibliográfica. Anticorpos monoclonais (AcM) podem ser obtidos por meio da produção de hibridomas, imortalização de células B de indivíduos infectados e criação de bibliotecas de anticorpos sintéticas. Anticorpos obtidos utilizando uma dessas três metodologias têm sido utilizados em estudos para terapia e diagnóstico. Durante essa revisão, foram identificados anticorpos que reconhecem a proteína NS1 do ZIKV com potencial para uso em diagnóstico. A proteína NS1 vem sendo amplamente utilizada como antígeno em testes do tipo ELISA desenvolvidos para uso comercial. Também foram identificados durante a revisão 13 anticorpos promissores para uso em terapia, sendo que alguns deles possuem mutação LALA, que poderia prevenir a ocorrência de potencialização da infecção dependente de anticorpos (ADE) entre flavivírus.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais, flavivírus, vírus Zika, diagnóstico, terapia.

## ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) belongs to the genus *Flavivirus* and has single stranded RNA genome. Its structure is related to other viruses from *Flavivirus* genus, such as dengue and yellow fever. ZIKV infection presents symptoms such as skin rash and fever, with neurological problems such as Guillain-Barre syndrome and microcephaly. ZIKV is transmitted through the bite of infected *Aedes* mosquitoes and its diagnosis is based on viral RNA detection. There is no currently vaccine or specific treatment for ZIKV infection. Monoclonal antibodies (mAbs) for ZIKV could be an alternative for therapeutic treatment and diagnosis without cross reaction. The present study aimed to evaluate the current antibodies developed against ZIKV through evaluation of their ability on therapy and diagnosis through a review. mAbs could be obtained by the production of hybridomas, B cell immortalization from infected individuals and development of synthetic antibody libraries. Antibodies obtained from these three methods can be used for therapy and diagnosis. This review identified antibodies against the ZIKV-NS1 as potential for diagnostic tool. In addition, NS1 protein has been widely used as an antigen in ELISA tests developed for commercial use. Furthermore, it was found 13 promising antibodies for use in therapy. Interestingly, some of these antibodies have the LALA mutation and may be able to prevent the occurrence of antibody dependent enhancement (ADE) among flaviviruses.

Key words: Monoclonal antibodies, flavivirus, Zika virus, therapy and diagnosis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL .....	10
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
4. REVISÃO DE LITERATURA GERAL .....	11
4.1 ANTICORPOS .....	11
4.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS E SUA OBTENÇÃO .....	12
4.3 TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	13
4.3.1 TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS .....	13
4.3.2 TÉCNICA DE PHAGE DISPLAY .....	17
4.3.3 TÉCNICAS DE IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS B .....	20
5. REVISÃO DE LITERATURA ESPECÍFICA PARA ZIKA .....	23
5.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ZIKA.....	23
5.2 UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS NA TERAPIA DA INFECÇÃO PELO ZIKA.....	35
5.3 POTENCIALIZAÇÃO DEPENDENTE DE ANTICORPOS ( <i>ANTIBODY DEPENDENT ENHANCEMENT - ADE</i> ) ENTRE DENV E ZIKV.....	46
6. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE 1- TABELA CONTENDO A LITERATURA SELECIONADA	
APÊNDICE 2 - RESUMO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS PARA ZIKV OU FLAVIVIRUS MAIS PROMISSORES DISCUTIDOS NA REVISÃO	

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. Ele possui genoma de RNA fita simples não segmentado com senso positivo e aproximadamente 11 kb de tamanho. A estrutura do ZIKV é altamente similar aos quatro sorotipos de dengue (DENV) e a outros vírus globalmente relevantes como o vírus da febre amarela (YFV) e o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (ZHAO et al., 2016).

A estrutura dos flavivírus consiste em uma partícula esférica pequena composta por três proteínas estruturais – capsídeo, envelope e pré-membrana/membrana – um genoma de RNA e um envelope lipídico. A proteína de envelope (E) é composta por três domínios diferentes conectados à membrana viral por uma estrutura em hélice. Essa proteína é responsável por iniciar o processo de entrada e saída do vírus da célula e também é o alvo primário para anticorpos neutralizantes. Todos os três domínios da proteína de envelope possuem epítomos que são reconhecidos por anticorpos capazes de neutralizar uma infecção (DOWD et al., 2011). Além das proteínas estruturais, os flavivírus produzem sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que desempenham funções reguladoras e de expressão do vírus, como a replicação, virulência e patogenicidade (SANTOS et al., 2008).

O ZIKV foi primeiramente reportado em Uganda em 1947, quando foi isolado do soro de um macaco Rhesus (DICK, 1952). No entanto, apenas em 2007 foi registrada a primeira epidemia causada por este vírus, em Yap, na Micronésia (DUFFY et al., 2009). Na Polinésia Francesa, em 2013, outra epidemia foi registrada com elevado número de casos e alguns relatos de complicações neurológicas e doenças autoimunes em áreas com cocirculação de DENV (IOOS et al., 2014). Em maio de 2015, no Brasil, foram reportados os primeiros casos de transmissão autóctone do vírus Zika na região Nordeste (ZANLUCA et al., 2015). Em novembro de 2015 foi confirmada pelo Instituto Evandro Chagas a primeira morte decorrente de infecção pelo ZIKV. A partir de então, o vírus se dispersou rapidamente pelo país e hoje há confirmação da transmissão autóctone nas 27 unidades federativas do Brasil. Em 2016, foram notificados mais de 200 mil casos suspeitos e em 2017 já são mais de 4 mil casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).



No Brasil, observam-se condições favoráveis à ocorrência de doenças causadas por flavivírus por consequência da grande diversidade de artrópodes vetores e de reservatórios para vertebrados, aliada às condições climáticas e ao fato de que grande parte da população está exposta aos vírus (KUNIHOLM et al., 2006; FIGUEIREDO, 2007). A infecção pelo vírus Zika faz parte da Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública.

O ZIKV é transmitido para humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados. Além disso, sabe-se que pode haver transmissão vertical do ZIKV de mulheres grávidas para o feto e que isso pode resultar em malformações fetais. Estudos recentes revelaram que o ZIKV pode também ser transmitido através de contato sexual (CDC, 2017). Em humanos a infecção por ZIKV apresenta sintomas que duram de 2 a 7 dias, incluindo *rash* cutâneo, geralmente pruriginoso, febre moderada, conjuntivite, dores musculares e nas articulações, dor de cabeça e tonturas (DUFFY et al., 2009; ZANLUCA et al., 2016). Além dessas manifestações, o ZIKV está associado a meningoencefalites e outras doenças neurológicas, como síndrome de Guillain-Barré (RUSSO et al., 2017). Modelos murinos demonstraram que a infecção por ZIKV pode causar mudanças patológicas em placentas, incluindo apoptose de trofoblasto e anormalidades em capilares (MINER et al., 2016).

Atualmente não há vacina disponível, nem tratamento específico para a infecção por ZIKV, sendo ainda a melhor forma de prevenção a proteção contra a picada dos mosquitos vetores. Em função disso, diversos estudos vêm sendo realizados visando a identificação de fármacos antivirais (RAY; SHI, 2006). Anticorpos capazes de neutralizar esses vírus são uma alternativa, podendo ser usados para fins terapêuticos. O entendimento das bases moleculares e estruturais de anticorpos com potencial neutralizante vem sendo realizado através do estudo de anticorpos monoclonais (VANBLARGAN et al., 2016). Sabe-se que o tratamento de certas infecções com anticorpos policlonais foi usado por décadas. No entanto, desde que houve a primeira descrição de produção de anticorpos monoclonais, eles rapidamente se tornaram valiosos não apenas para uso terapêutico, mas também para diagnóstico laboratorial de patógenos e pesquisa científica (WEINER, 2015).

Devido ao cenário atual de infecções causadas pelo vírus Zika no mundo e às dificuldades encontradas na área de diagnóstico e controle do vírus, se torna importante o estudo dos anticorpos monoclonais já produzidos contra ZIKV e também suas possíveis aplicações na área de diagnóstico e terapia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Fazer um levantamento do potencial para uso terapêutico e em diagnóstico dos atuais anticorpos monoclonais desenvolvidos contra o vírus Zika.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Descrever técnicas utilizadas para desenvolvimento de anticorpos monoclonais disponíveis na literatura;
- Descrever testes diagnósticos disponíveis para o vírus Zika, fazendo um paralelo com o uso de anticorpos monoclonais;
- Encontrar quais anticorpos específicos para o vírus Zika já foram desenvolvidos e discutir seu potencial para terapia;
- Definir o potencial dos anticorpos gerados em uma infecção primária por flavivírus de causar uma potencialização da doença dependente de anticorpos (*Antibody dependent enhancement* – ADE).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho consistiu em uma revisão bibliográfica, a qual teve por objetivo a avaliação das técnicas utilizadas para produção de anticorpos monoclonais e a avaliação de anticorpos produzidos contra o vírus Zika. Para este fim, foram utilizadas literaturas relacionadas ao assunto de bancos de dados como PubMed, SciELO e ScienceDirect.

Foram utilizados artigos de todos os anos pesquisados através da combinação das palavras-chave Zika, anticorpos monoclonais (ou *monoclonal antibodies*), *phage display*, diagnóstico e terapia. A literatura selecionada nesta busca está apresentada no apêndice 1 na forma de tabela. A produção de anticorpos monoclonais e a relação com o tema da revisão foram os critérios para a escolha inicial dos artigos.

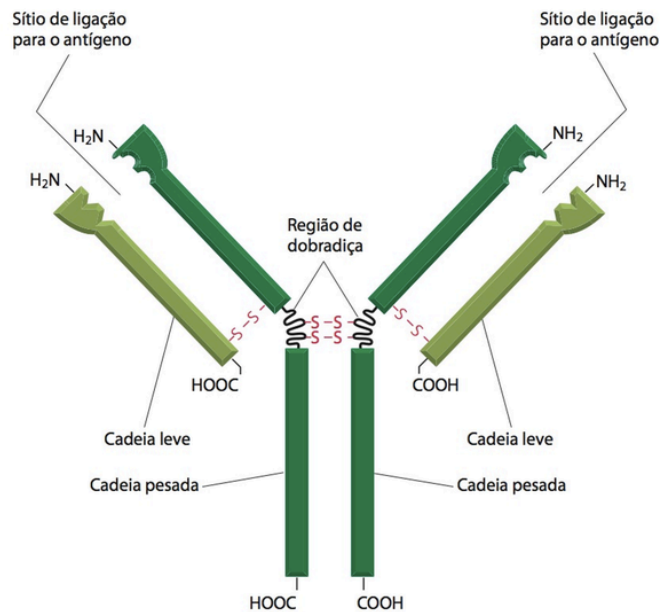
### 3 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

#### 4.1 ANTICORPOS

Anticorpos são sintetizados exclusivamente por células B, em bilhões de formas com diferentes sequências de aminoácidos. Eles pertencem à classe de proteínas chamada de imunoglobulinas (Ig) (ALBERTS et al., 2014). As imunoglobulinas consistem em duas cadeias pesadas (H) e duas leves (L), sendo que em humanos a cadeia L pode consistir de cadeia  $\kappa$  ou  $\lambda$  e a cadeia H das cadeias  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ . Cada cadeia contém um sítio de ligação ao antígeno formado por regiões N-terminais de cadeias leves e por regiões N-terminais de cadeias pesadas. As duas cadeias pesadas formam a região de cauda e região da dobradiça da molécula de anticorpo. As quatro cadeias são mantidas unidas pela combinação de ligações não-covalentes e covalentes (dissulfeto) (Figura 1) (ALBERTS et al., 2008; SCHROEDER et al., 2010).

Em uma resposta imune adaptativa, a proteção do organismo contra patógenos extracelulares e suas toxinas ocorre por meio dos anticorpos e linfócitos T. Os anticorpos circulam como um dos principais componentes do plasma no sangue, linfa e estão presentes nas superfícies mucosas. A ligação dos anticorpos a um patógeno pode neutralizar o patógeno e também marcar os patógenos para destruição e ativação do sistema complemento (PARHAM, 2011; ALBERTS et al., 2014).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MOLÉCULA DE IMUNOGLOBULINA.

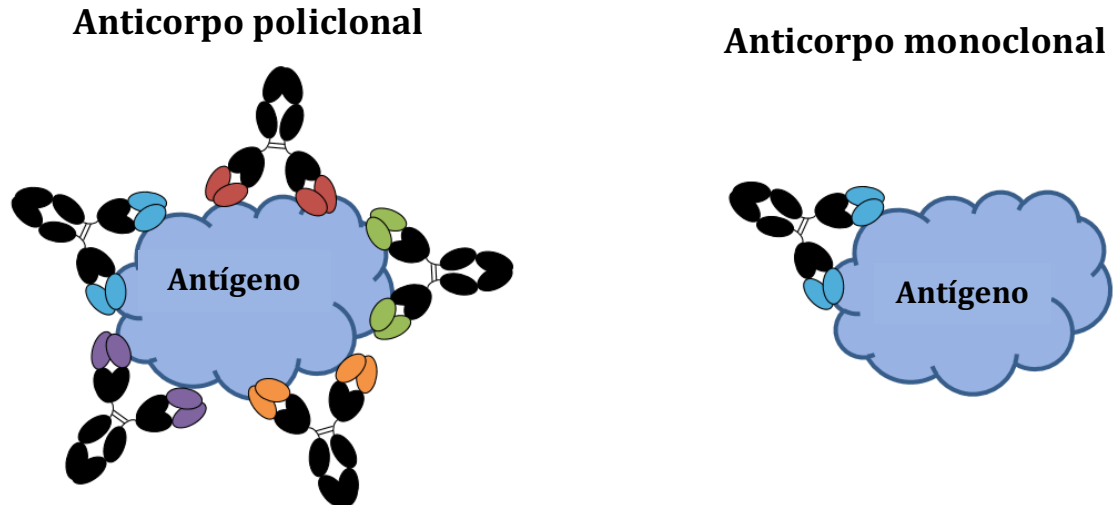


FONTE: ALBERTS et al., 2008

#### 4.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS E SUA OBTENÇÃO

Anticorpos monoclonais são anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo e são obtidos a partir de um único clone de célula B (LIU, 2014). Devido a esta característica de especificidade, muitas vezes os anticorpos monoclonais são preferíveis aos anticorpos policlonais quando é necessário um reconhecimento do antígeno específico (Figura 2). Entre as técnicas principais de obtenção de anticorpos monoclonais estão a produção de hibridomas de células tumorais com linfócitos B antígeno-específicos obtidos de camundongos imunizados ou de indivíduos imunes e a criação de bibliotecas de anticorpos sintéticas (LANZAVECCHIA et al., 2007).

FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTANDO A COMPARAÇÃO ENTRE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS.



FONTE: Absoluteantibody. Disponível em: < <http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibodies-as-tools/>>

#### 4.3 TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

##### 4.3.1 TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS

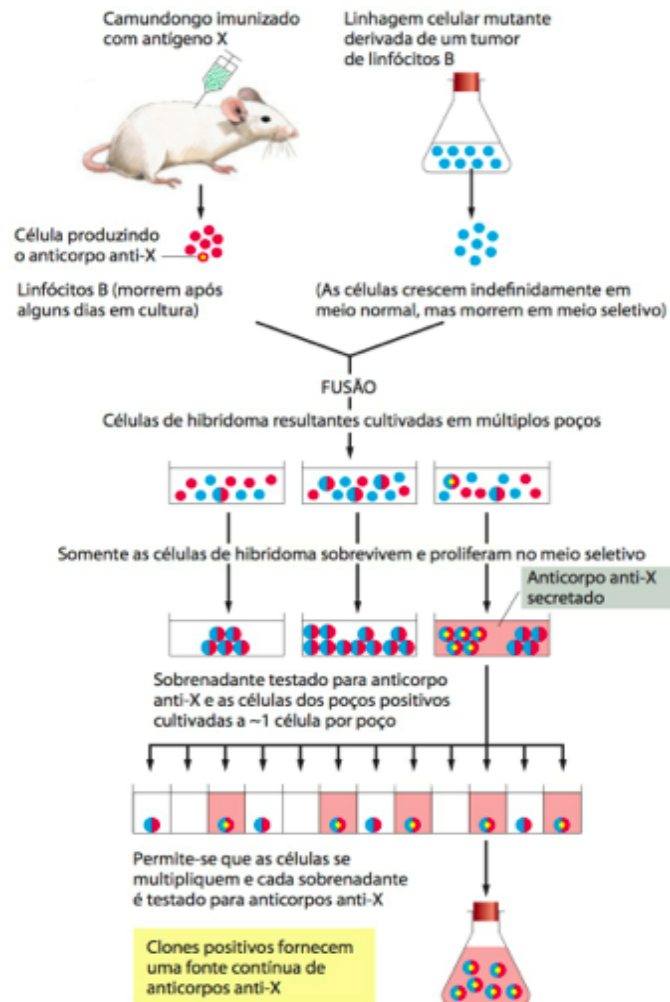
Uma das formas de produção laboratorial de anticorpos se dá pela imunização de animais com o antígeno de interesse e subsequente obtenção de anticorpos a partir do soro do animal. No entanto, a obtenção de anticorpos é dependente do soro de animais e resulta em uma mistura heterogênea de anticorpos que reconhecem uma variedade de epítopos. A obtenção de anticorpos monoclonais através da geração de hibridomas permite produzir uma quantidade ilimitada de anticorpos de especificidade idêntica (ALBERTS et al., 2014).

A técnica para geração de hibridomas foi descrita em 1975 pelos ganhadores do prêmio Nobel em Fisiologia (1984) César Milstein e Georges Köhler na revista científica *Nature*, no artigo “*Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined*

*specificity*". Neste artigo, os autores demonstraram a geração de células produtoras de anticorpos monoclonais anti-hemácias de carneiro obtidas da fusão de células de mieloma e linfócitos B de camundongo imunizado com células vermelhas de carneiro. Os pesquisadores observaram que as células híbridas poderiam crescer *in vitro* com alta taxa de proliferação de células para obtenção de grandes quantidades de anticorpos específicos. Além disso, essas células produtoras de anticorpos seriam imortais devido à fusão com o mieloma e poderiam ser selecionadas com a adição de meio contendo HAT (hipoxantina, aminopteria e timidina) (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Um esquema exemplificando os passos para obtenção de anticorpos monoclonais pode ser visto na Figura 3.

O sucesso dessa técnica depende da seleção das células híbridas em meio HAT, contendo aminopterina. A aminopterina é uma droga da classe antifolato capaz de bloquear a via *de novo* de produção de purinas e timidilato, essenciais para síntese de DNA. Células normais como os esplenócitos são capazes de utilizar vias de salvamento utilizando hipoxantina e timidina exógenas (também presentes no meio HAT). Os mielomas, no entanto, são deficientes em uma ou mais enzimas dessas vias. Dessa forma, a suplementação celular com meio contendo HAT seleciona apenas células híbridas, pois o mieloma não é capaz de utilizar vias de salvamento e, apesar de os esplenócitos serem capazes de utilizar vias de salvamento, eles não conseguem sobreviver em cultivo celular e acabam entrando em apoptose naturalmente após alguns dias. O processo de bloqueio de síntese de DNA está ilustrado na Figura 4 (ALBERTS et al., 2008).

**FIGURA 3 - ESQUEMA REPRESENTANDO AS ETAPAS PARA OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR MEIO DA GERAÇÃO DE HIBRIDOMAS.**

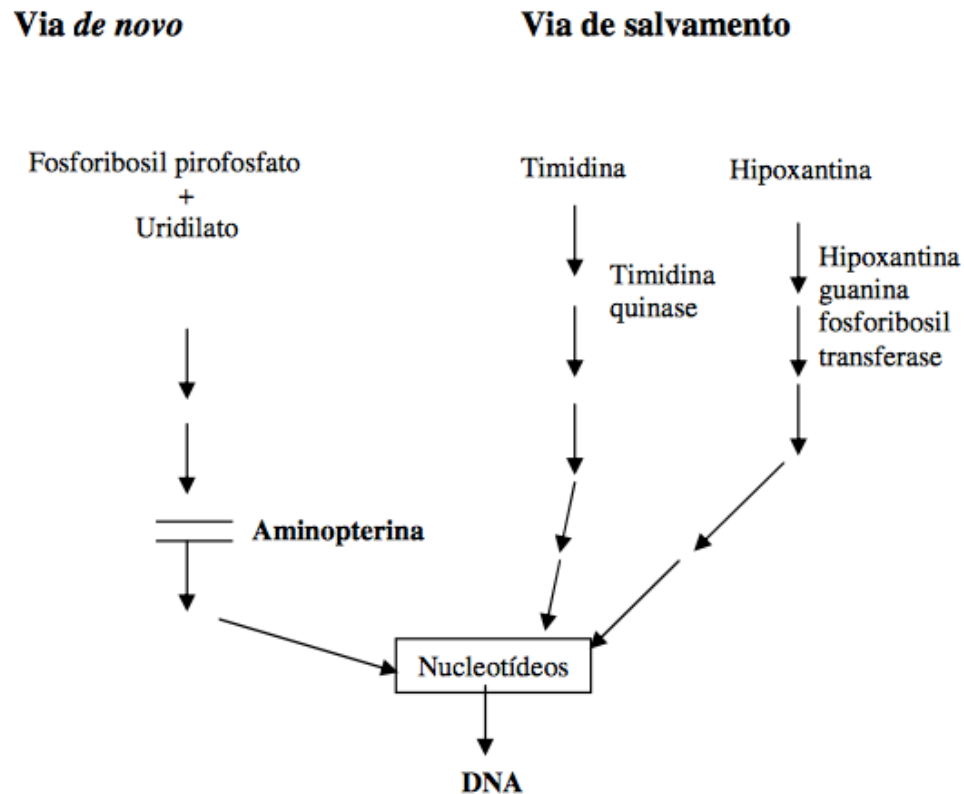


FONTE: ALBERTS ET AL. (2008)

Essa tecnologia foi revolucionária, pois possibilitou a propagação de clones individuais a partir de uma única célula híbrida fornecendo uma fonte duradoura e estável de um único tipo de anticorpo, o que significa o reconhecimento de um único sítio antigênico. A geração de hibridomas tem como vantagem a produção de anticorpos monoclonais contra qualquer proteína encontrada em uma amostra sorológica, podendo ser produzido para detectar uma proteína específica de interesse em células ou tecidos e também em métodos de purificação de proteínas (ALBERTS et al., 2008). Desde então,

anticorpos monoclonais são usados amplamente em pesquisas, diagnóstico e tratamento de doenças como infecções e câncer (WARD, 1998). Anticorpos monoclonais podem ser uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas que não possuem vacina ou um tratamento específico eficaz como é o caso das infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório e do câncer colorretal (MEULEN, TER, 2007; SCOTT et al., 2012).

FIGURA 4 – ESQUEMA REPRESENTANDO O BLOQUEIO DA SÍNTESE DE DNA PELA VIA DE NOVO PELA DROGA AMINOPTERINA E ATIVAÇÃO DAS VIAS DE SALVAMENTO.



FONTE: ABBAS ET AL. (2008)

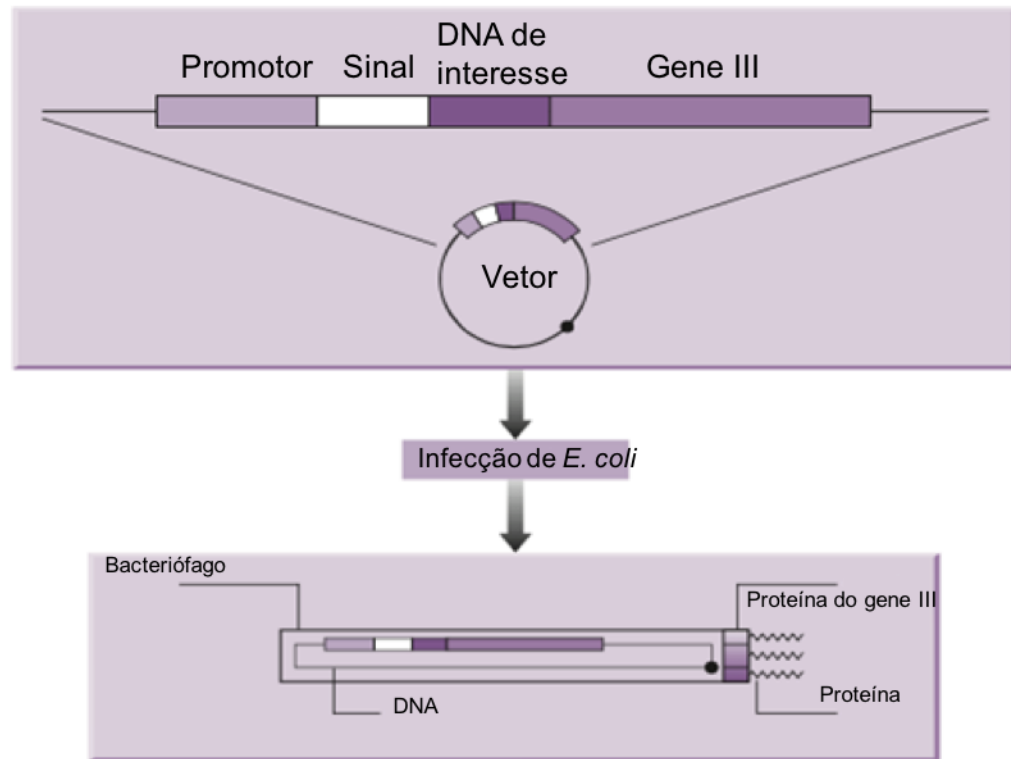


#### 4.3.2 TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY*

A produção de anticorpos monoclonais através da tecnologia de hibridomas foi um grande avanço para a ciência, no entanto essa tecnologia apresenta desvantagens para uso terapêutico de anticorpos. Como os anticorpos produzidos por hibridomas são de origem murina, o próprio anticorpo pode ser reconhecido como um antígeno, ativando a resposta imune quando utilizado para terapia em humanos. Devido a este problema, os anticorpos que estão atualmente sendo desenvolvidos para fins terapêuticos são de origem humana ou humanizados para prevenir essa imunogenicidade (FRENZEL et al., 2013).

Uma alternativa é a geração de anticorpos humanos recombinantes utilizando o *phage display*, uma técnica independente do sistema imune. A metodologia foi desenvolvida primeiramente para *E. coli* fago M13 por Parmley & Smith em 1988 (SCHIRRMANN et al., 2011). Além do fago M13 é possível utilizar outros sistemas de *phage display* como o fago T7 e Lambda, no entanto o sistema mais comum é sistema M13 (KÜGLER et al., 2013). Essa técnica é chamada *phage display* porque envolve uma apresentação das proteínas na superfície de um bacteriófago (BROWN T, 2010). A técnica consiste na inserção de genes que codificam as proteínas de interesse no genoma de bacteriófagos, entre o peptídeo sinal e o gene de uma proteína de capsídeo do bacteriófago, para então gerar uma biblioteca. Cada biblioteca pode conter bilhões de anticorpos ou peptídeos diferentes. Após a transfecção do vetor em *E. coli*, essa fusão do gene direciona a síntese de uma proteína híbrida, feita parcialmente da proteína de capsídeo do fago e do produto do gene clonado. Essa inserção é feita de modo que as proteínas de interesse sejam expressas na superfície do bacteriófago, fusionadas à proteína do capsídeo. Esquema representando a fusão do gene da proteína de interesse com um gene de M13 está representado na Figura 5 (PRIMROSE et al., 2006; BROWN T et al., 2010).

FIGURA 5 - PRINCÍPIO DE PHAGE DISPLAY PARA PROTEÍNAS



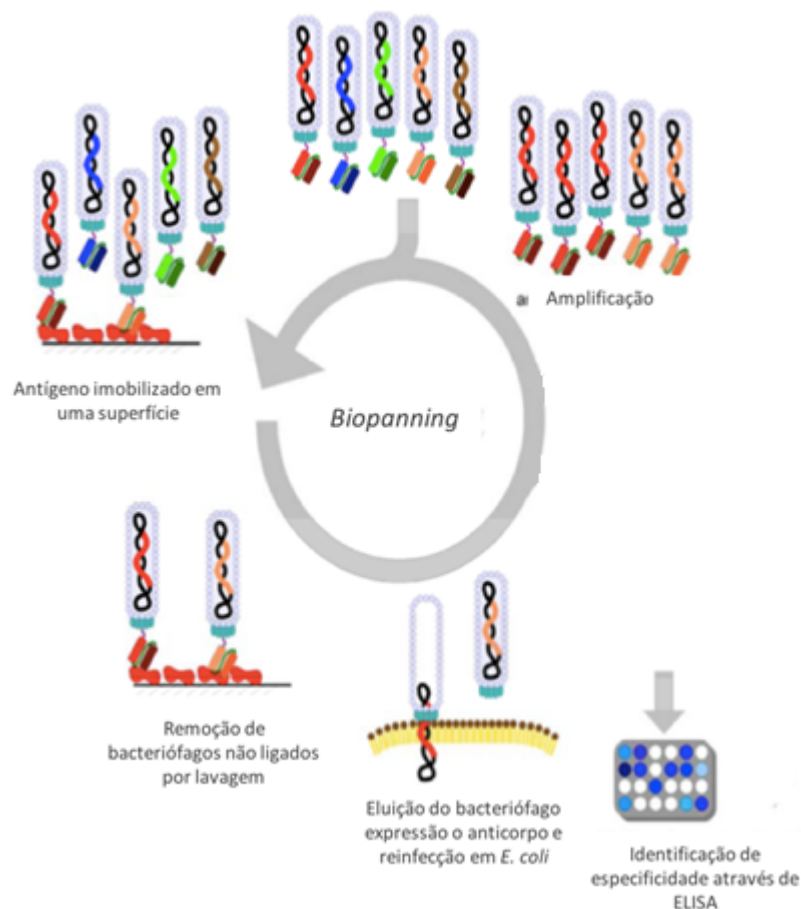
FONTE: Adaptado de PRIMROSE et al. (2006).

Dessa maneira é possível inserir genes de fragmentos de anticorpos que serão fusionados com a proteína do capsídeo sendo expostos na superfície do fago (SCHIRRMANN et al., 2011).

Para a seleção de anticorpos de interesse, uma biblioteca com uma grande quantidade de partículas de fagos com diferentes fragmentos de anticorpos contra diferentes antígenos é criada. O processo para a seleção de anticorpos específicos para o antígeno de interesse é chamado de *biopanning*. Esse processo é baseado em ciclos repetidos de incubação, lavagem, amplificação e seleção de fagos ligados. A molécula alvo (antígeno de interesse) pode ser imobilizada em placa de microtitulação, colunas para cromatografia de afinidade ou *beads* magnéticas. O antígeno então é incubado com a biblioteca de *phage display* apresentando os diferentes anticorpos (BAZAN et al., 2012).

Durante a incubação, parâmetros físicos, químicos e biológicos podem ser controlados para que os anticorpos sejam capazes de se ligarem ao respectivo antígeno sob condições definidas. As partículas de fago apresentando os anticorpos que se ligarem fracamente ou não se ligarem ao antígeno são removidas através de lavagens. Os fagos com anticorpos específicos são eluídos e re-amplificados através de infecção em *E. coli*. Após vários ciclos de *panning*, os anticorpos solúveis ou os anticorpos ligados ao fago são produzidos e a ligação específica ao antígeno é testada, por ex. através de ELISA. Um esquema ilustrando as etapas de *biopanning* está representado na Figura 6.

FIGURA 6 - ESQUEMA PARA SELEÇÃO DE ANTICORPOS POR *BIOPANNING*.



FONTE: Adaptado de SCHIRRMANN et al. (2011).

Devido a limitações de dobramento adequado desses fragmentos proteicos sintetizados por *E. coli*, apenas fragmentos de anticorpos, como fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv), fragmentos de ligação ao antígeno (Fabs) e domínio pesado variável de humanos (dAbs) que se liga especificamente sem um domínio de cadeia leve correspondente, são usados rotineiramente para produção de anticorpos por *phage display* (SCHIRRMANN et al., 2011). Anticorpos de *phage display* são difíceis de produzir em cultura celular e há a necessidade de conhecer o antígeno primeiramente, uma vez que a seleção é baseada na ligação do *phage display* ao antígeno purificado. Consequentemente, esse sistema não é recomendado para produção de anticorpos contra todos os patógenos (CORTI et al., 2014; OSHEROVICH et al., 2010).

#### 4.3.3 TÉCNICAS DE IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS B

Uma opção para a obtenção de anticorpos humanos, é a imortalização de células B obtidas de camundongos transgênicos ou diretamente de doadores humanos. Camundongos transgênicos que carregam o gene de imunoglobulina humana produzem anticorpos em resposta a uma imunização, sendo essa uma alternativa para o isolamento de anticorpos humanizados. Por outro lado, a obtenção de anticorpos de doadores humanos oferece a vantagem de explorar a capacidade de reconhecimento e neutralização dos anticorpos humanos em resposta ao patógeno humano e também gera anticorpos com alta afinidade para diferentes epítomos, o que é uma vantagem pois a partir da resposta imune humana é possível gerar anticorpos específicos para uma variedade de antígenos (CORTI et al., 2014; LANZAVECCHIA et al., 2007).

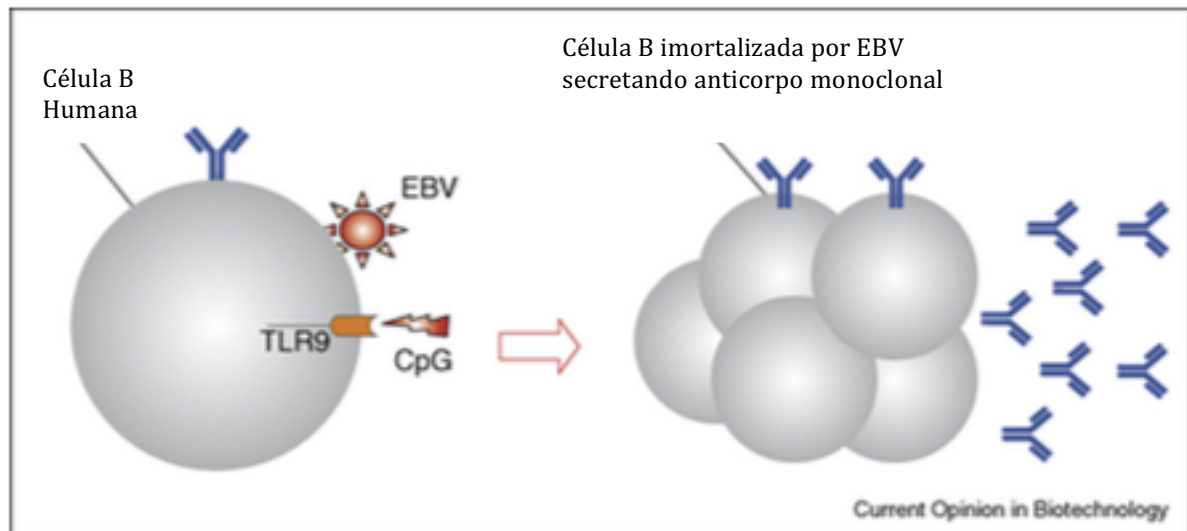
Em uma resposta imune típica, uma variedade de anticorpos é produzida por células B após a exposição ao patógeno. Algumas células B com alto grau de afinidade se desenvolvem em células de memória e assim, quando há uma nova exposição ao patógeno, essas células realizam a resposta imune. Células B de memória possuem um vasto repertório de especificidade a antígenos, promovendo um grande benefício para a imunidade de humanos/animais quando infectados com uma variedade de patógeno. A identificação de células B que produzem anticorpos de interesse é um desafio porque

células plasmáticas têm tempo de vida curto e são difíceis de serem cultivadas *in vitro* (OSHEROVICH, 2010; KUROSAKI et al., 2015).

Células plasmáticas são acessíveis no sangue apenas por um curto tempo, o qual pode ser difícil de prever em uma infecção natural. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) podem ser isoladas do sangue periférico de humanos ou animais através de centrifugação por gradiente de densidade seguida por seleção através de *beads* imunomagnéticas que se ligam ao receptor CD19<sup>+</sup> presente nas células B (HUGGINS et al., 2007). Essas células podem ser cultivadas com meio suplementado com interleucina-6 (IL-6), uma citocina que auxilia na sobrevivência da célula plasmáticas (CORTI et al., 2011). É possível produzir diferentes fragmentos de cadeia leve e pesada codificados por genes presentes em células plasmáticas por meio de clonagem e expressão do gene do anticorpo. Isso pode ser feito através de bibliotecas de *phage display*, isolando os genes da região variável das cadeias pesada e leve (VH e VL) das células plasmáticas da medula óssea e também através do isolamento de genes VH e VL emparelhados de células plasmáticas através de *single cell* PCR (LANZAVECCHIA et al., 2007).

Em contraste com células plasmáticas, que estão completamente diferenciadas, células B de memória ainda possuem potencial de crescimento e podem ser imortalizadas pelo vírus Epstein Barr (EBV). Células B imortalizadas por EBV secretam anticorpos em grande quantidade, permitindo detectar anticorpos específicos no meio de cultivo dessas células por meio de ensaios de ligação ao antígeno e neutralização (LANZAVECCHIA et al., 2007). Para melhorar a eficiência de produção e imortalização das células B infectadas com EBV, um agonista do receptor TLR9 – um ativador da resposta imune – como o CpG pode ser adicionado ao meio de cultura (FIGURA 7) (ASHKAR et al., 2002; TRAGGIAI et al., 2004).

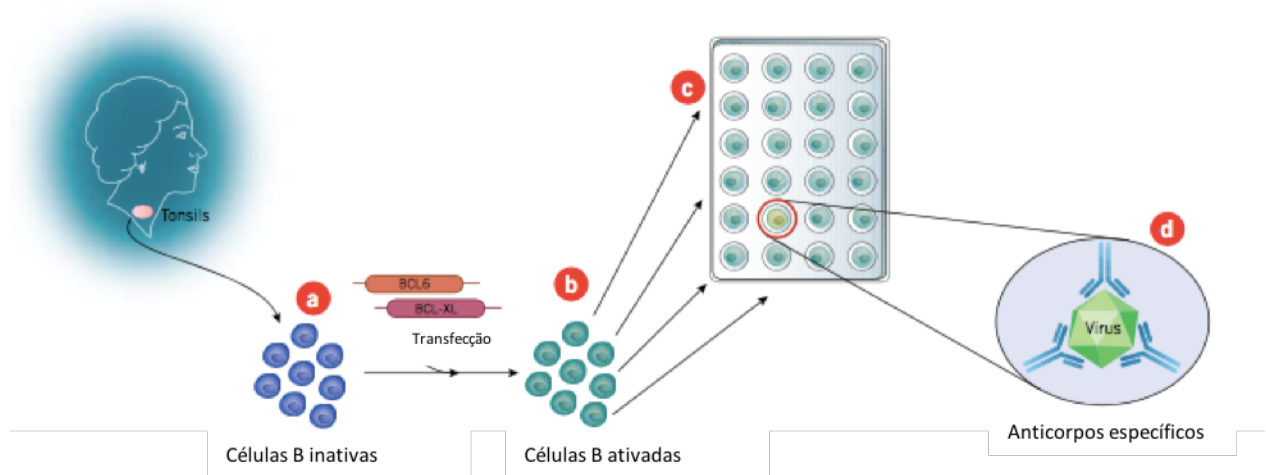
FIGURA 7 - IMORTALIZAÇÃO DE CELULAS B POR INFECÇÃO COM VIRUS EPSTEIN BARR.



FONTE: ADAPTADO DE LANZAVECCHIA et al. (2007)

Outra forma de imortalizar células B é realizando a transfecção dessas células com dois fatores de transcrição - célula B de linfoma 6 (Bcl-6) e Bcl-XL - que ativam a célula para um estado proliferativo com secreção de anticorpos (Figura 8) (OSHEROVICH, 2010). Células B maduras podem ser cultivadas *in vitro* com a adição de fatores que ativam a resposta imune como CD40L e citocinas (IL-4, IL-10, IL-21), sendo a citocina IL-21 responsável pela diferenciação em células plasmáticas com altas taxas de secreção de imunoglobulina. A prevenção da diferenciação terminal em plasmócitos pode resultar na longevidade de células B ativadas em cultura por mais tempo. O fator de transcrição Bcl-6 impede que ocorra a diferenciação, facilitando a expansão das células B (KWAKKENBOS et al., 2010).

FIGURA 8 - ESQUEMA PARA IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS B POR TRANSFEÇÃO COM FATORES DE TRANSCRIÇÃO.



LEGENDA: PRIMEIRAMENTE, CÉLULAS B INATIVAS DE MEMÓRIA SÃO COLETADAS DA TONSILA DE INDIVÍDUOS QUE ADQUIRIRAM UMA INFECÇÃO VIRAL OU FORAM VACINADOS (A). AS CÉLULAS SÃO TRANSFECTADAS COM OS GENES CÉLULAS B LINFOMA 6 (BCL6) E BCL-XL, QUE SÃO FATORES PROLIFERATIVOS ENVOLVIDOS NA REATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DE MEMÓRIA (B). A TRANSFEÇÃO LEVA A CÉLULA A UM ESTADO PROLIFERATIVO SECRETOR DE ANTICORPOS (C). AS CÉLULAS SÃO CLONADAS ATRAVÉS DE DILUIÇÃO LIMITANTES E TRIADAS PARA HABILIDADE DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA O ANTÍGENO DE INTERESSE (D).

FONTE: ADAPTADO DE OSHEROVICH (2010).

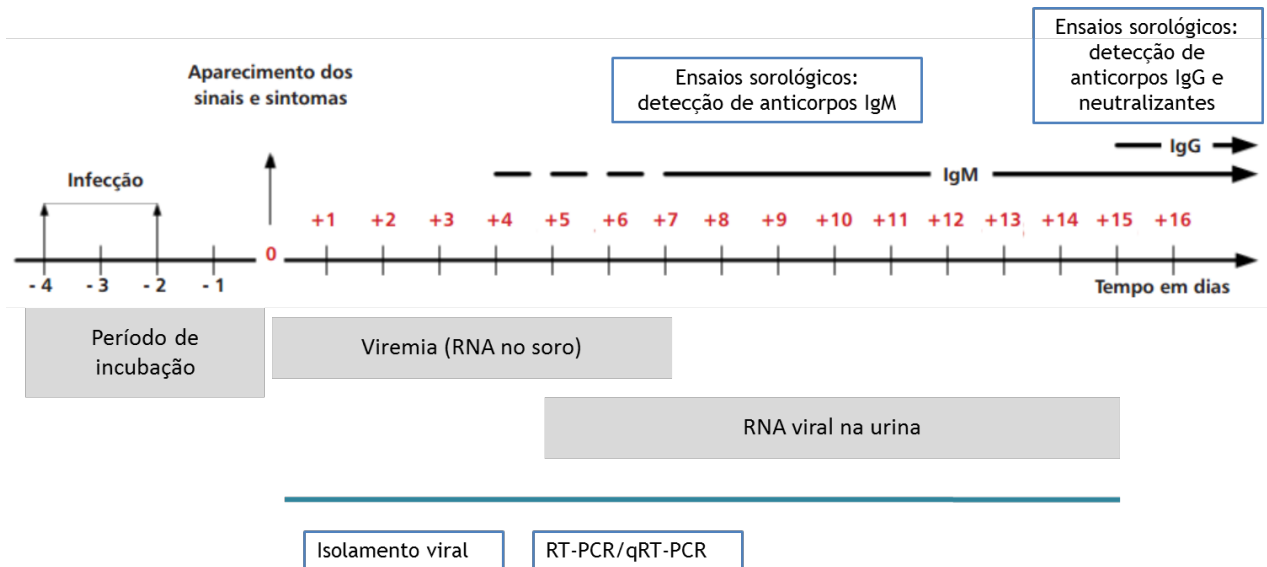
## 5 REVISÃO DE LITERATURA ESPECÍFICA PARA ZIKA

### 5.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ZIKA

Atualmente o diagnóstico de Zika é predominantemente realizado através da detecção do RNA viral por PCR em tempo real, detecção de IgM anti-ZIKV ou ensaios de neutralização. Cada tipo de ensaio é recomendado para um determinado período da infecção pelo ZIKV. Os testes para detecção do RNA viral podem ser realizados na fase de viremia, que dura apenas 5 a 7 dias no soro e até 15 dias na urina. A partir do 7º dia

da infecção, o organismo passa a produzir anticorpos IgM, sendo possível realizar ensaios sorológicos após a fase de viremia (Figura 9). Os ensaios utilizados, seu uso, limitações e aplicabilidade estão listados na Tabela 1.

FIGURA 9 - OPORTUNIDADE DE DETECÇÃO DO VÍRUS ZIKA SEGUNDO TÉCNICAS LABORATORIAIS (ISOLAMENTO, REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA – RT-PCR – E SOROLOGIA – IGM/IGG)



FONTE: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016)



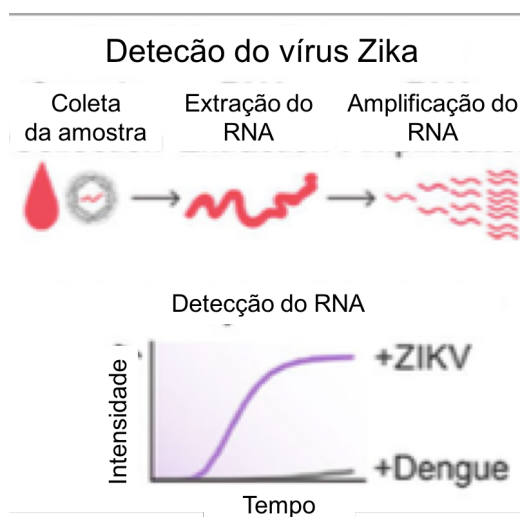
<b>Método</b>	<b>Uso</b>	<b>Limitações</b>	<b>Aplicação clínica</b>
<b>RT-PCR</b>	Detecção de RNA viral em fluidos e tecidos	Viremia baixa e transiente	Teste mais sensível
<b>Isolamento viral</b>	Isolamento do vírus de fluidos e tecidos	Necessário métodos especializados como cultura celular; dificuldade devido à baixa viremia	Usado na pesquisa
<b>Deteccão de IgM anti-ZIKV</b>	Detecta IgM depois de uma semana da infecção	Reação cruzada com outros flavivírus	Utilizado depois de período de viremia
<b>Teste de neutralização pela redução de placa (PRNT)</b>	Ajuda a diferenciar a reação dos anticorpos para diferentes flavivírus	Usa vírus ativo para o ensaio e pode haver reação cruzada	Pode ser usado para confirmar resultados positivos no ELISA para detecção de IgM

TABELA 1 – RESUMO DOS MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA.  
FONTE: ADAPTADO DE LANDRY (2017)

O isolamento viral é reconhecido como padrão ouro para detecção viral desde a década de 1960. O isolamento em cultura celular pode ser feito em células C6/36 (do inseto *Ae. albopictus*), células Vero (derivadas de rim do macaco verde Africano), entre outras. As amostras são incubadas com a cultura celular sob condições apropriadas visando o isolamento do vírus presente na amostra do paciente. No entanto, além das dificuldades encontradas na técnica, para alguns vírus como o ZIKV, a viremia transitória e em baixos títulos reduz a aplicabilidade do isolamento viral no diagnóstico de rotina.

Desde seu desenvolvimento, a RT-PCR em tempo real se tornou uma importante ferramenta para caracterização viral. Para realizar esse ensaio, é necessário extrair o RNA viral da amostra do paciente e realizar a amplificação através de termociclagem utilizando oligonucleotídeos específicos para o genoma do ZIKV (Figura 10). Essa técnica é considerada extremamente sensível e específica para detecção do RNA de ZIKV, no entanto possui como limitação o tempo para detecção do RNA viral que está presente no organismo (em geral, apenas até o 15º dia de infecção). Após esse período de tempo é possível realizar apenas os ensaios de detecção de anticorpos.

FIGURA 10 – ESQUEMA PARA DETECÇÃO DO RNA DO ZIKV POR PCR EM TEMPO REAL.

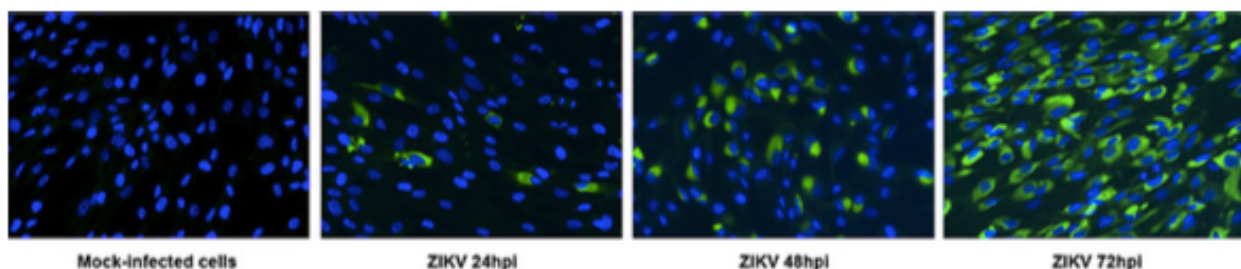


FONTE: (YANG et al., 2017)

O uso de ELISA para a detecção de IgM no soro do paciente, no seu formato atual para ZIKV, é muito laborioso. Esse ensaio requer a sensibilização de placas de 96 poços com anti-IgM humano, seguido da incubação com o soro a ser testado e, então, com o antígeno de ZIKV. O vírus é reconhecido caso haja a presença de anticorpos anti-ZIKV no soro do paciente. Devido à alta incidência de reação cruzada com outros flavivírus, como DENV 1, 2, 3 e 4 e vírus da febre amarela, a taxa de resultados falso-positivos é alta (LANDRY et al., 2017). A técnica de imunofluorescência indireta (IFI)

também pode ser utilizada para a detecção de anticorpos anti-ZIKV no soro do paciente, no entanto ela enfrenta os mesmos problemas de reações falso-positivas (YANG et al., 2017). A Figura 11 mostra a relação entre o tempo de infecção e o número de células infectadas com o ZIKV por imunofluorescência.

FIGURA 11 – IMUNOFLUORESCÊNCIA MOSTRANDO A DETECÇÃO DO ZIKV.

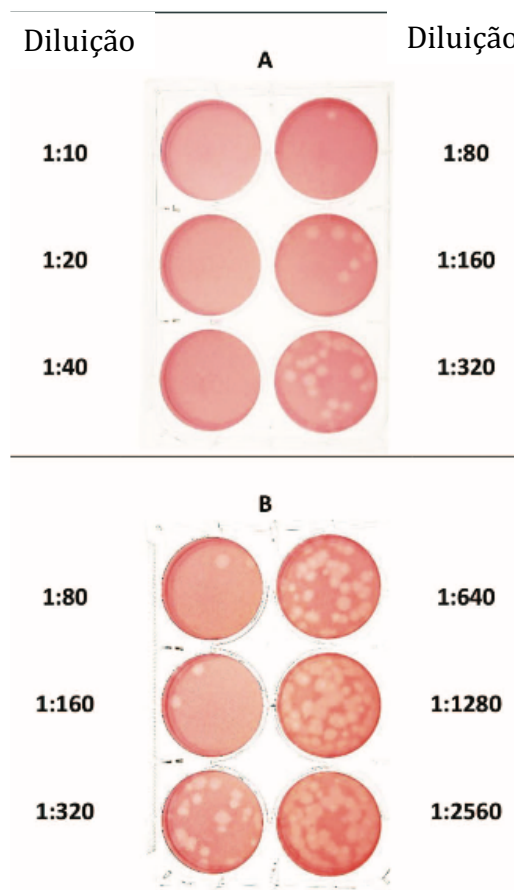


LEGENDA: CÉLULAS DE FIBROBLASTO INFECTADAS COM ZIKV FORAM ANALISADAS EM DIFERENTES TEMPOS APÓS A INFECÇÃO COM O USO DO ANTICORPO ANTI-FLAVIVIRUS 4G2, QUE RECONHECE A PROTEÍNA DE ENVELOPE DOS FLAVIVIRUS, E ANTICORPO ANTI- IgG DE CAMUNDONGO CONJUGADO COM FITC.

FONTE: (YANG et al., 2017)

Para reduzir os resultados falso-positivos, é recomendado que resultados positivos para ELISA sejam confirmados através do teste de neutralização por redução de unidades formadoras de placa (PRNT). Nesse método, diluições seriadas do soro do paciente são incubadas com o vírus para permitir a interação entre vírus-anticorpo. Essa mistura é então incubada com cultura celular e, após um tempo definido, essas células são fixadas e coradas para contagem das unidades formadoras de placa. Quanto maior a concentração de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV no soro do paciente, maior será seu poder neutralizante contra o vírus (LANDRY et al., 2017)(Figura 12).

FIGURA 12 – ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACA REALIZADO COM SORO DE PACIENTE INFECTADO POR ZIKV.



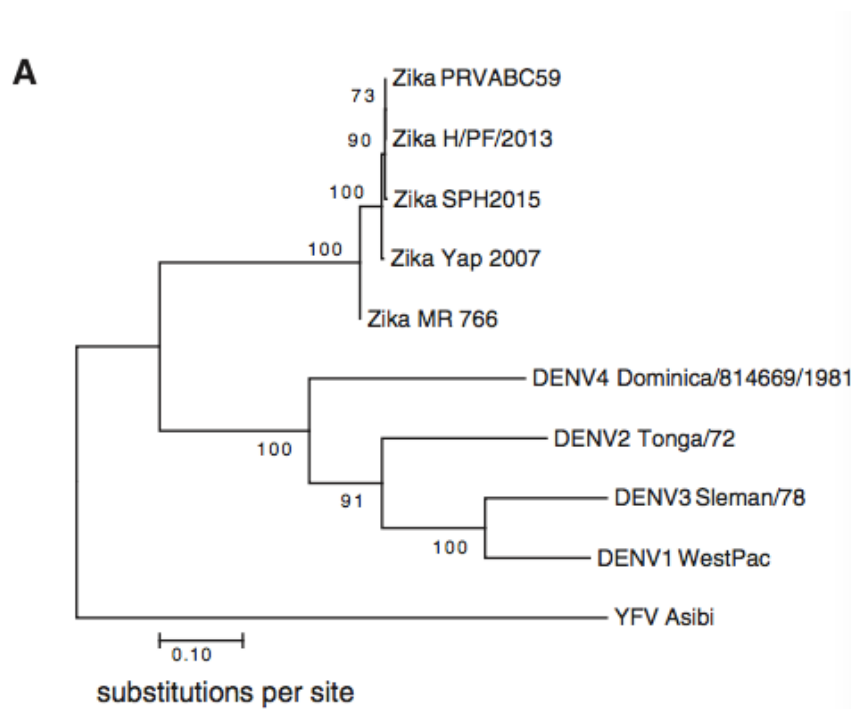
LEGENDA: PRNT DE UM PACIENTE COM INFECÇÃO AGUDA (A) E CONVALESCENTE (B) CONTRA O ZIKV. FOI UTILIZADA A CÉLULA VERO PARA REALIZAR O ENSAIO. O TÍTULO É DEFINIDO COMO A DILUIÇÃO DO SORO CONTENDO ANTICORPO ANTI-ZIKV CAPAZ DE REDUZIR 90% DAS PLACAS VIRAIS.

FONTE: (LANDRY et al., 2017)

O diagnóstico de ZIKV enfrenta muitos obstáculos, pois os principais métodos apresentam desvantagens como a viremia baixa e transiente ou a alta reatividade cruzada com outros flavivírus. O desenvolvimento de um diagnóstico sorológico tem como desafio a redução dessa incidência de reação cruzada. A grande similaridade genética e estrutural entre os vírus desse gênero encontrada no compartilhamento de sequências de aminoácidos entre as proteínas estruturais de ZIKV e DENV é

possivelmente a causa de haver reação cruzada imunossorológica entre esses dois vírus, o que pode influenciar no resultado dos diagnósticos. Na figura 13 está representada a árvore filogenética da proteína E de ZIKV e DENV. Os ramos e suas distâncias representam o número de substituição por sítio na sequência genética, mostrando que os ramos da proteína E de ZIKV e DENV derivam do mesmo ramo e compartilham essa semelhança genética (PRIYAMVADA et al., 2017).

FIGURA 13 – SIMILARIDADE NA SEQUENCIA ENTRE A PROTEÍNA DE ENVELOPE DE ZIKV E DENV.



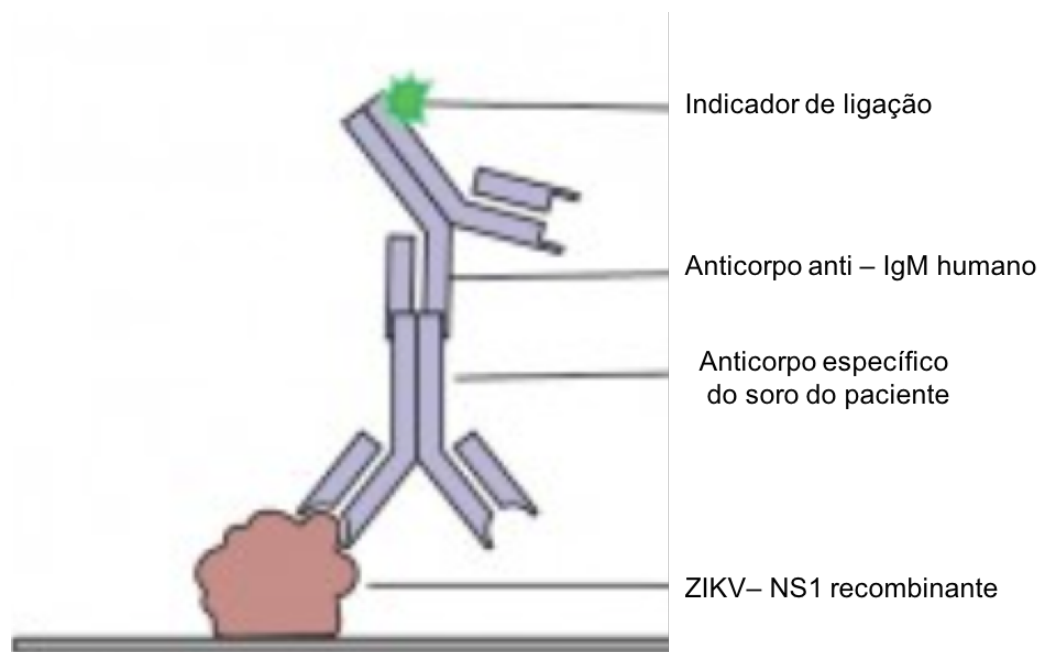
LEGENDA: ARVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A RELAÇÃO BASEADA NA SEQUENCIA DA PROTEINA E DE ZIKV E DENV. A PORCENTAGEM DE ÁRVORES COM O QUAL A SEQUÊNCIA VIRAL SE AGRUPA É MOSTRADA PERTO DOS RAMOS. OS RAMOS FORAM DESENHADOS EM ESCALA COM DISTANCIA MEDIDA DE ACORDO COM O NUMERO DE SUBSTITUIÇÃO POR SÍTIO NA SEQUENCIA GENÉTICA.

FONTE: (PRIYAMVADA ET AL., 2017)

Para o desenvolvimento de diagnóstico sorológico de flavivírus, os antígenos mais utilizados são a proteína de envelope, prM e NS1. Dentre estas, a proteína NS1 tem se demonstrado altamente imunogênica e importante no desenvolvimento de anticorpos não neutralizantes. Além disso, a NS1 contém mais epítomos específicos do que a proteína de envelope. Devido a essa característica, a proteína NS1 pode ser um importante antígeno para desenvolvimento de um diagnóstico sorológico (CLETON et al., 2015).

A função da proteína NS1 do ZIKV permanece pouco entendida, no entanto sua importância na replicação do RNA, transporte intracelular de proteínas, saída do vírus da célula e função imunomodulatória vêm sendo propostas. Através do estudo de DENV e WNV, foi identificada a secreção dessa proteína por células infectadas na corrente sanguínea, portanto no soro de pacientes infectados há a presença de anticorpos anti-NS1 (STEINHAGEN et al., 2016). Dois *kits* de diagnóstico de ELISA – ZIKV IgG ELISA e ZIKV IgM ELISA – utilizando NS1 recombinante de ZIKV como antígeno foram desenvolvidos pelo grupo de Leubeck e produzidos pela Euroimmun e sua especificidade foi testada pelos grupos de Huzly (2016) e Steinhagen (2016) e colaboradores. Uma ilustração de como o teste funciona está representada na Figura 14.

FIGURA 14 – ESQUEMA ILUSTRANDO COMO O DIAGNOSTICO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ZIKV – NS1 FUNCIONA.



LEGENDA: O TESTE É BASEADO NA SENSIBILIZAÇÃO DA PLACA DE ELISA COM A PROTEÍNA NS1 RECOMBINANTE DE ZIKV COM POSTERIOR DETECÇÃO PELO ANTICORPO ESPECÍFICO ANTI-NS1 DO SORO DO PACIENTE.

FONTE: Adaptado de THERMO SCIENTIFIC PROTOCOL (2010)

No estudo de Huzly et al. (2016), foram testados os soros de 10 pacientes com infecção aguda ou convalescente por ZIKV previamente testados negativamente para DENV através de ELISA e positivamente para ZIKV por imunofluorescência. Todos os soros foram positivos para o ELISA de detecção de IgM anti-ZIKV. Para o ELISA de detecção de IgG, 6 dos 10 pacientes posteriormente confirmados para infecção de ZIKV foram positivos, no entanto isso pode ter ocorrido devido ao desenvolvimento de IgG ser mais tardio. Este ensaio preliminar mostra uma alta sensibilidade do kit de ELISA utilizando NS1, em especial o teste para detecção de IgM.

O grupo de Steinhagen e colaboradores (2016) avaliou esse *kit* de ZIKV-NS1 para detecção de IgM anti-ZIKV através de um estudo com pacientes e viajantes de áreas endêmicas e com infecção por ZIKV confirmada através de RT-PCR. Para este estudo foram utilizados os soros de 27 pacientes testados positivamente para ZIKV através de

RT-PCR e 85 pacientes que tiveram seu soro testado através de imunofluorescência indireta. No entanto, para este último grupo, é importante lembrar que há a possibilidade de ter ocorrido reação cruzada na imunofluorescência e que podem haver falso positivos. O teste de ELISA utilizando como antígeno a proteína NS1 de ZIKV para detecção de IgM ou IgG anti-ZIKV obteve 100% de sensibilidade e 99,8% de especificidade quando feita uma combinação dos resultados do ELISA de detecção de IgM e IgG e para amostras coletadas após o sexto dia do início dos sintomas (SA-NGASANG et al., 2006; STEINHAGEN et al., 2016). Este estudo apresenta limitações como o número de soros de indivíduos confirmados para ZIKV através de RT-PCR. Apesar de o estudo ter sido mais completo do que o realizado por Huzly e colaboradores (2016), é necessário utilizar um número maior com pacientes de áreas endêmicas e não endêmicas.

Atualmente um outro tipo de ELISA utilizando NS1 vem sendo usado em países como Inglaterra e Brasil. Esse ELISA foi intitulado de NS1 BOB ELISA (NS1 *blockade-of-binding*). O ELISA desenvolvido utiliza NS1 de ZIKV para sensibilizar a placa e o anticorpo monoclonal específico anti-NS1 ZKA35 como controle positivo. Para o estudo da especificidade desse teste, foram utilizados 75 soros de pacientes confirmados através de RT-PCR para infecção por ZIKV e o teste apresentou 95% especificidade e 92% de sensibilidade (BALMASEDA et al., 2017).

Devido à atual epidemia do ZIKV e às complicações que a infecção pode trazer, também é importante que sejam desenvolvidos testes rápidos para detecção do vírus. O grupo de Bosch e colaboradores (2017) desenvolveu um teste rápido para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando um anticorpo monoclonal que foi desenvolvido por meio da geração de hibridomas. Uma relação com os dez anticorpos monoclonais desenvolvidos e suas características estão representadas na Tabela 2.



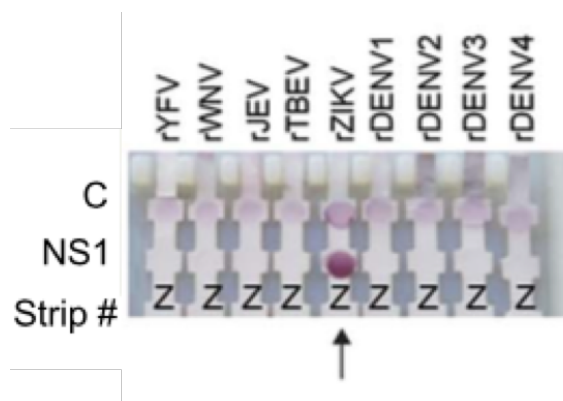
Anticorpo	Uso em teste rápido	Epítipo linear de NS1	Posição
MA724.271	Membrane, dipstick 1 (DENV1) nanoparticles, dipstick 5 (pan-DENV)	DENV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT	109
MA7729.912	Nanoparticles, dipstick 1 (DENV1)	DENV1 NS1: IPKIYGGPISQHNRYR	243
MA7729.1	Membrane, dipstick 2 (DENV2)	DENV1 NS1: MEHKYSWKSWSGKAKII DENV1 NS1: IPKIYGGPISQHNRYR	109 243
MA7732.243	Nanoparticles, dipstick 2 (DENV2) nanoparticles, dipstick 5 (pan-DENV)	DENV2 NS1: CRSCTLPPLRYRGEDGCW	318
MA724.55	Membrane, dipstick 3 (DENV3) membrane, dipstick 4 (DENV4)	DENV1 NS1: IPKIYGGPISQHNRYR DENV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT DENV3 NS1: GVFTTNIWKLREVTYQ DENV4 NS1: GFGMFTTNIMKFKREG	243 109 161 159
MA724.411	Nanoparticles, dipstick 3 (DENV3) nanoparticles, dipstick 5 (pan-DENV)	DENV1 NS1: IPKIYGGPISQHNRYR DENV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT DENV1 NS1: IWLKLRDSYTMCDH	243 109 167
MA725.626	Nanoparticles, dipstick 4 (DENV4) nanoparticles, dipstick 5 (pan-DENV)	DENV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT DENV4 NS1: GFGMFTTNIMKFKREG DENV4 NS1: MPPLRFLGEDGCWYGME	109 159 318
MA724.323	Membrane, dipstick 5 (pan-DENV)	DENV1 NS1: MEHKYSWKSWSGKAKII DENV2 NS1: TELKYSWKTWGLAKAKML DENV3 NS1: MELKYSWKTWGLAKIVT DENV3 NS1: GVFTTNIWKLREVTYQ DENV4 NS1: PVNDLKYSWKTWGLAKI	109 114 109 161 107
7746-50.110	Membrane, ZIKV NS1 dipstick	ZIKV NS1: KECPLKHRAWNSFLV ZIKV NS1: LSFRAKDGWCWYGMEI	141 321
7746-50.130	Nanoparticles, ZIKV NS1 dipstick	ZIKV NS1: NELPHGWKAWGKSYF	109

TABELA 2 – ANTICORPOS MONOCLONAIIS ANTI-FLAVIVÍRUS, APLICAÇÕES NA IMUNOCROMATOGRÁFIA, SEQUÊNCIA DO EPÍTOPO LINEAR QUE O ANTICORPO RECONHECE E POSIÇÃO DOS DOMÍNIOS.

FONTE: (BOSCH ET AL., 2017)

O teste rápido desenvolvido é em formato de teste imunocromatográfico usando anticorpos anti-NS1. Para testar a habilidade de detectar NS1, foram usados soros de pacientes infectados com ZIKV e também soros de pacientes infectados com DENV 1, 2, 3 e 4 e outros flavivírus para avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos das amostras dos pacientes (Figura 15). No entanto, o teste é válido apenas durante a fase de viremia da doença, na qual é possível detectar o antígeno NS1. Após essa fase, somente é viável a realização do diagnóstico através de testes de detecção de anticorpo anti-ZIKV.

FIGURA 15 – TESTE RÁPIDO DE IMUNOCROMATOGRÁFICA PARA DETECÇÃO ESPECÍFICA DA PROTEÍNA ZIKV NS1.

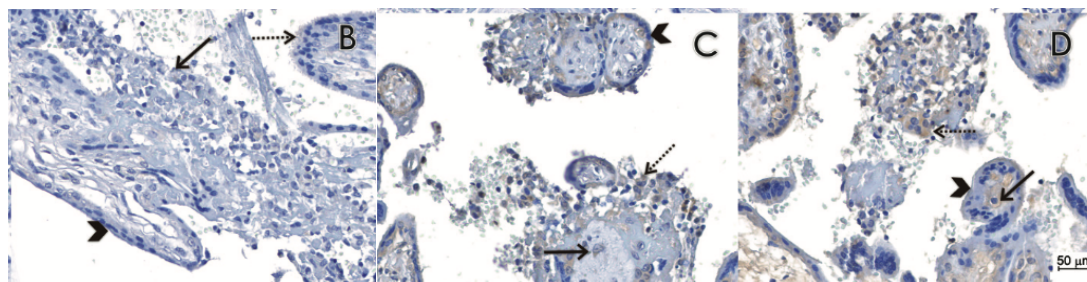


LEGENDA: PARA DETERMINAR A ESPECIFICIDADE DO TESTE FORAM UTILIZADOS SOROS DE PACIENTES INFECTADOS COM VÍRUS DA FEBRE AMARELA (YFV), VÍRUS DO OESTE DO NILO (WNV), VÍRUS DA ENCEFALITE TRANSMITIDA POR CARRAPATO (TBEV), ZIKV E DENV 1, 2, 3 E 4 NA TIRA COM NS1 DE ZIKV (Z) E CONTROLE POSITIVO (C). O TESTE FOI REATIVO APENAS PARA O SORO DO PACIENTE INFECTADO COM ZIKV.

FONTE: (BOSCH ET AL., 2017)

Para o melhor entendimento da infecção pelo ZIKV, estudos utilizam a técnica de imunohistoquímica para detectar a presença do vírus no tecido de animais infectados e também na placenta de pacientes. O uso de anticorpos monoclonais nesta técnica, em especial para detecção do vírus na placenta, é muito importante, pois permite confirmar a infecção da mãe pelo ZIKV durante a gestação, podendo servir de alerta para uma possível doença congênita na criança (HUGHES et al., 2016; NORONHA et al., 2016; KAWIECKI et al., 2017) (Figura 16).

FIGURA 16 – ACHADOS PATOLÓGICOS E REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA EM TECIDO PLACENTÁRIO



LEGENDA: (B) REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA FEITA COM UM ANTICORPO NÃO RELACIONADO (ANTI- CHIKUNGUNYA) (C) E (D) REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA FEITA COM O ANTICORPO ANTI-FLAVIVIRUS 4G2.

FONTE: ADAPTADO DE NORONHA ET AL., 2016

## 5.2 UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS NA TERAPIA DA INFECÇÃO PELO ZIKA

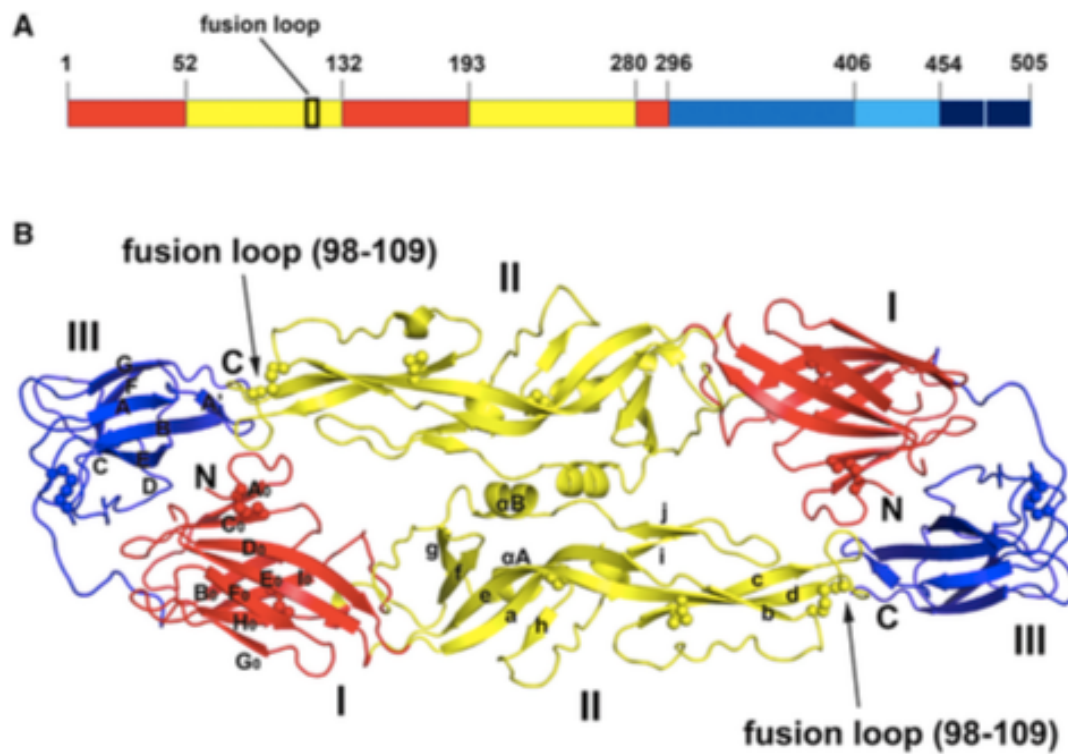
A habilidade do ZIKV de infectar fetos e causar severas complicações requer o desenvolvimento de drogas eficazes contra o vírus e também seguras para a mãe e o feto, podendo ser administradas durante a gravidez. Para isso, é fundamental que a droga seja capaz de atravessar a barreira placentária para alcançar o feto e também a barreira hematoencefálica, devido ao neurotropismo apresentado pelo ZIKV. Estudos publicados recentemente demonstram que a geração de anticorpos neutralizantes pode ser uma alternativa segura para o tratamento da infecção pelo ZIKV (NORONHA et al., 2016; MUNJAL et al., 2017).

Os pesquisadores do grupo de Sapparapu e colaboradores (2016) isolaram células B secretoras de anticorpos anti-ZIKV de pacientes previamente infectados por este vírus. Essas células foram cultivadas em presença do vírus Epstein-Barr e triadas para reconhecimento da proteína E de ZIKV previamente desenvolvida pelo grupo. Como anticorpo mais promissor para terapia, o grupo obteve o anticorpo monoclonal ZIKV-117 (AcM ZIKV-117), que se liga a proteína E ZIKV no domínio DII (Figura 17) e foi capaz de

neutralizar duas cepas africanas do vírus (MR 766 e Dakar 41519), duas asiáticas (Malaysia P6740 e H/PF/2013) e a americana (Brasil Paraíba 2015).

Diversos grupos já demonstraram através de estudo *in vivo* que o vírus Zika consegue infectar a placenta e o feto durante a gravidez, resultando em dano na barreira placentária, infecção do feto e mal-formação no feto em desenvolvimento (Figuras 18, 19 e 20) (MINER et al., 2016; YOCKEY et al., 2016). Para determinar a atividade terapêutica do AcM ZIKV-117 durante o desenvolvimento fetal, camundongos fêmeas foram tratadas com ZIKV-117, foram utilizados três modelos da doença, *wild type* (wt), mais patogênico (*severe*) e outro menos patogênico (*mild*). Estes três modelos permitiram o estudo do possível uso do anticorpo em diferentes realidades da doença. Um dia após o tratamento, os camundongos foram infectados com a cepa ZIKV-DAKAR resultando em níveis do RNA de ZIKV em torno de 50% menores na placenta e no cérebro fetal do grupo tratado com ZIKV-117, quando comparado com o grupo controle. Esse fenômeno foi associado com o transporte do AcM ZIKV-117 através da barreira placentária (Figura 20) (SAPPARAPU et al., 2016). Conforme os ensaios realizados, o AcM ZIKV-117 se mostrou eficiente na profilaxia ou tratamento de camundongos infectados com o ZIKV, reduzindo em torno de 50% a infecção nas mães, e no tecido placentário e fetal, quando comparado com o grupo controle. Como indicado na Figura 20, o grupo tratado com o anticorpo ZIKV-117 além de apresentar menores taxas de RNA viral também apresentou um menor índice de processo apoptótico nos tecidos.

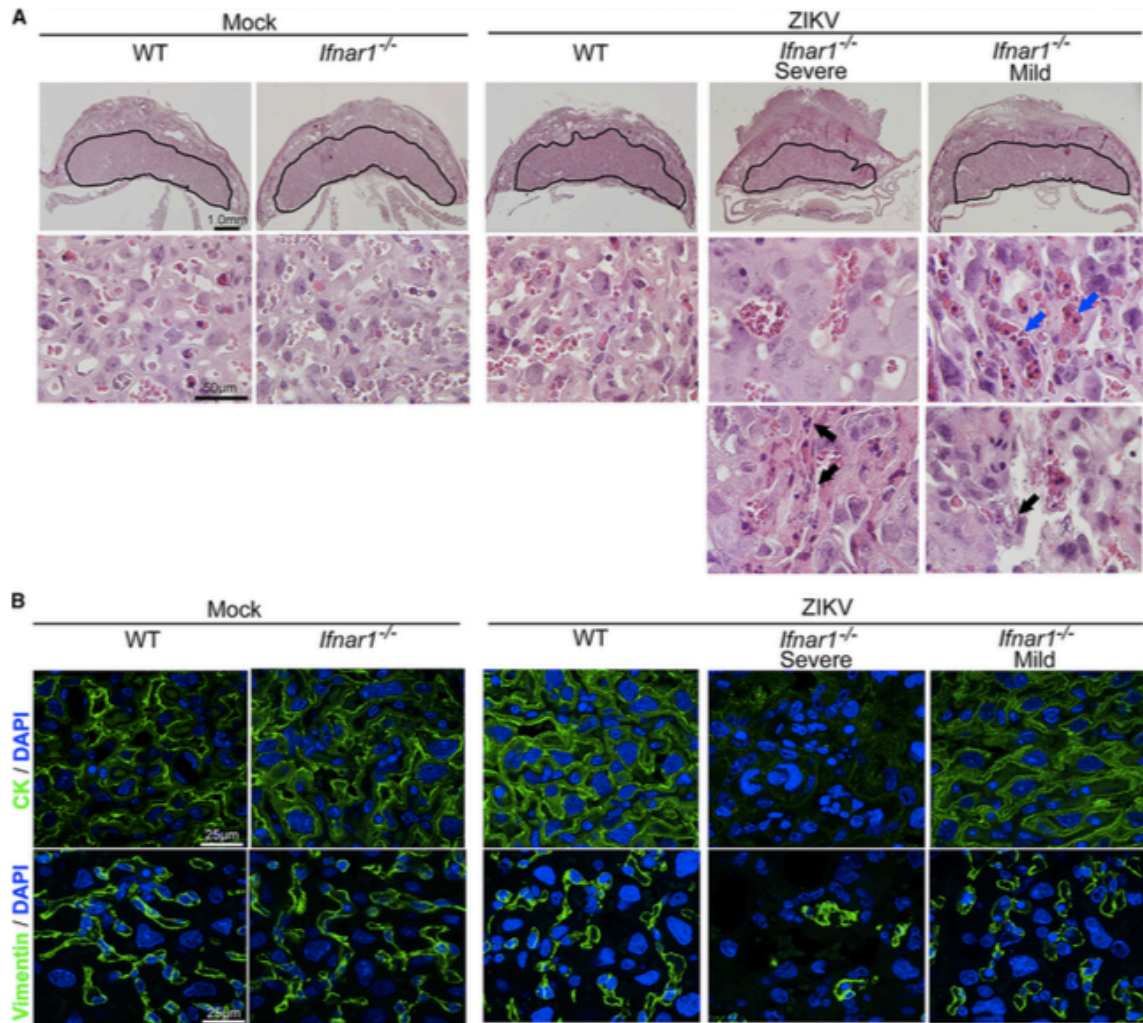
FIGURA 17 – ESTRUTURA GERAL DA PROTEÍNA DE ENVELOPE DO ZIKV (ZIKV-E)



LEGENDA: A – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DOS DOMÍNIOS PARA A PROTEÍNA E DE ZIKV (ZIKV-E). DOMÍNIO I (VERMELHO), DOMÍNIO II (AMARELO), E DOMÍNIO III (AZUL). B – ESTRUTURA EM DÍMERO DA ZIKV-E. ZIKV-E TEM TRÊS DOMÍNIOS DISTINTOS. DOMÍNIO II É RESPONSÁVEL PELA DIMERIZAÇÃO DE ZIKV-E. O LOOP DE FUSÃO É ESCONDIDO PELOS DOMÍNIOS I E II.

FONTE: (SAPPARAPU et al., 2016)

FIGURA 18 – INFECCÃO POR ZIKV LEVA A APOPTOSE E DANO VASCULAR PLACENTRARIO.



LEGENDA: OS CAMUNDONGOS FORAM INFECTADOS COM ZIKV E AS PLACENTAS FORAM SUBMETIDAS A ANALISE HISTOLÓGICA. PARA O EXPERIMENTO FORAM UTILIZADOS TRÊS GRUPOS, O PRIMEIRO WT, O SEGUNDO (SEVERE) COM MODIFICAÇÃO GENÉTICA PARA RETIRAR A CAPACIDADE DE RESPONDER OU PRODUZIR INTERFERON DO TIPO I (IFNAR1<sup>-/-</sup>) E O TERCEIRO (MILD) FOI TRATADO COM UM ANTICORPO BLOQUEADOR DE IFNAR1.

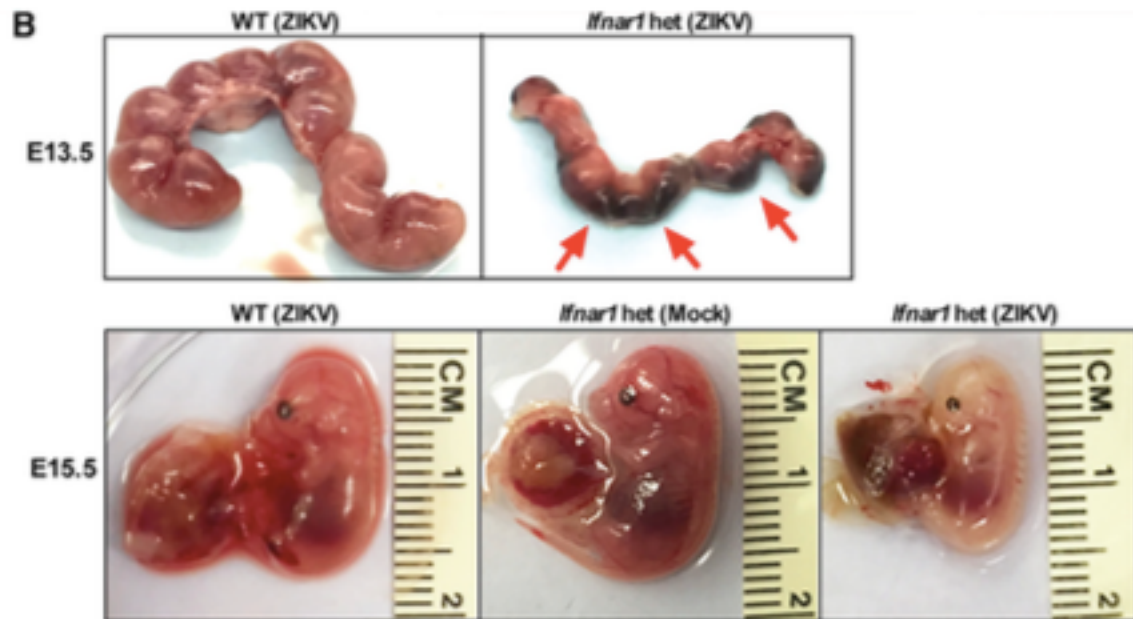
A – O TECIDO FOI CORADO COM HEMATOXILINA E EOSINA. A REGIÃO DO LABIRINTO INDICADA PELA FLECHA PRETA INDICA APOPTOSE DAS CÉLULAS DO TROFOBLASTO. AS FLECHAS AZUIS INDICAM ERITRÓCITOS NUCLEADOS DO FETO NA REGIÃO DOS CAPILARES FETAIS.

B – IMUNOFLUORESCENCIA DAS CELULAS DO TROFOBLASTO (MARCAÇÃO COM CK) E DO ENDOTÉLIO DOS CAPILARES FETAIS (MARCAÇÃO COM VIMENTINA) INDICA DANOS NA PLACENTA DO CAMUNDONGO INFECTADO COM ZIKV.

FONTE: ADAPTADO DE MINER ET AL. (2016)



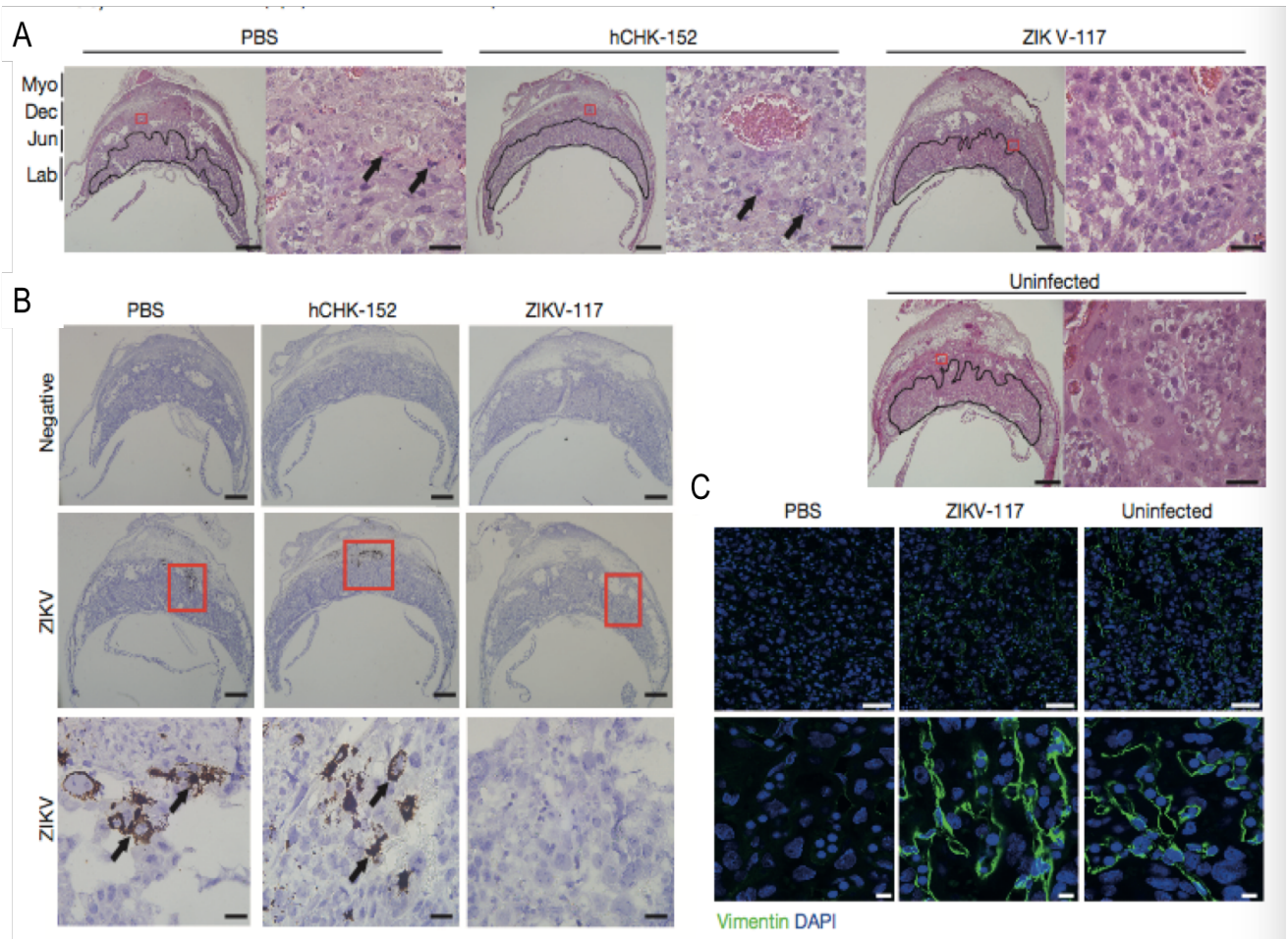
FIGURA 19 – FETOS INFECTADOS ATRAVÉS DE TRANSMISSÃO VERTICAL POR ZIKV



LEGENDA: FETOS DO DIA EMBRIONÁRIO 13.5 (E13.5) APÓS SEREM INFECTADOS COM O ZIKV NO E6.5. FORAM UTILIZADOS O GRUPO WT E IFNAR<sup>-/-</sup>. A MAIORIA DOS FETOS IFNAR<sup>-/-</sup> MORRERAM NO ÚTERO E FORAM REABSORVIDOS, RESTANDO APENAS RESÍDUOS DE PLACENTA. OS TRÊS PAINÉIS INFERIORES REPRESENTAM OS FETOS DOS TRÊS GRUPOS TESTADOS (WT (ZIKV), MOCK (CONTROLE NÃO INFECTADO) E IFNAR<sup>-/-</sup> (ZIKV), INDICANDO NO ÚLTIMO GRUPO REDUÇÃO DE CRESCIMENTO APÓS O E15.5.

FONTE: ADAPTADO DE MINER ET AL. (2016)

FIGURA 20 – EFEITO DO TRATAMENTO COM ZIKV-117 NA INFECÇÃO PELO ZIKV NA PLACENTA E FETO.



LEGENDA: FORAM UTILIZADOS QUATRO GRUPOS. TRÊS GRUPOS FORAM INFECTADOS COM ZIKV, SENDO O PRIMEIRO TRATADO APENAS COM PBS, O SEGUNDO FOI TRATADO COM UM ANTICORPO MONOCLONAL NÃO RELACIONADO AO ZIKV (HCHK-152), O TERCEIRO GRUPO TRATADO COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-ZIKV NEUTRALIZANTE (ZIKV-117); O QUARTO NÃO FOI INFECTADO (*UNINFECTED*).

A – O TECIDO DA PLACENTA FOI CORADO COM HEMATOXILINA E EOSINA NO E13.5. A ZONA DO LABIRINTO ESTA MARCADA COM UMA LINHA PRETA. FLECHAS PRETAS INDICAM TROFLOBLASTOS EM APOPTOSE EM ÁREAS CORRESPONDENTES A INFECÇÃO POR ZIKV. B – HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM MARCAÇÃO PARA RNA DE ZIKV. FLECHAS PRETAS INDICAM CELULAS POSITIVAS PARA PRESENÇA DE RNA DE ZIKV NA PLACENTA. C – IMUNOFLOURESCÊNCIA MARCANDO O ENDOTÉLIO DO CAPILAR FETAL, INDICANDO COMPROMETIMENTO DOS CAPILARES NO GRUPO TRATADO COM PBS.

FONTE: (SAPPARAPU ET AL., 2016)

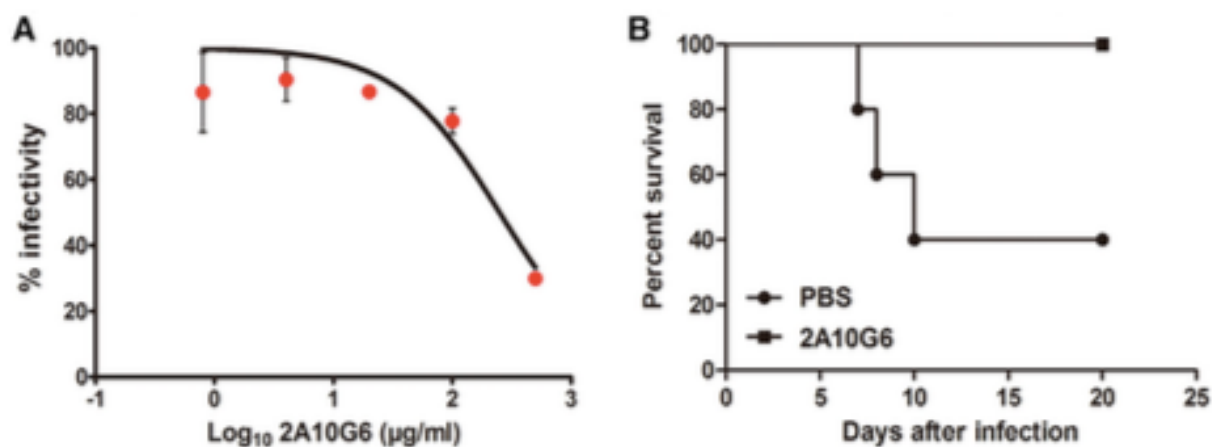


Seguindo a busca por um anticorpo monoclonal com capacidade neutralizante para flavivírus, o grupo de Deng et al. (2011) desenvolveu o anticorpo 2A10G6 com reconhecimento de um epítipo no *loop* de fusão da proteína E. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo* para sua capacidade neutralizante para os flavivírus DENV 1-4, YFV e WNV. O AcM apresentou atividade protetora em modelos animais contra DENV 1-4 e WNV. Devido ao grande potencial para uso em terapia para ZIKV, o grupo desenvolveu em 2016 um estudo para avaliar o potencial de neutralização e elucidar o complexo de ligação ZIKV-E/2A10G6.

Estudos realizados anteriormente pelo grupo através de *phage display biopanning* revelaram que o anticorpo 2A10G6 se liga ao epítipo <sup>98</sup>DRXW<sup>101</sup>, localizado dentro do *loop* de fusão da proteína de envelope de flavivírus. Como o ZIKV possui estrutura similar a outros flavivírus, a possibilidade de que 2A10G6 fosse neutralizante para ZIKV era alta. Portanto, testes *in vitro* de neutralização foram realizados através de ensaios de neutralização por redução de unidades formadoras de placa e testes de proteção foram realizados *in vivo*. O potencial terapêutico de 2A10G6 para ZIKV foi confirmado com 100% de sobrevivência dos camundongos tratados com o 2A10G6 contra 60% do grupo controle inoculado apenas com PBS. Através de ensaio de neutralização por redução de placas, houve uma inibição da infecção das células em 50% na concentração de 249 µg/ml do AcM 2A10G6 (Figura 21) (DAI et al., 2016).

Visando elucidar as bases moleculares da interação de ZIKV-E e 2A10G6, foi realizada uma cristalografia desse complexo, mostrando que o 2A10G6 se liga ao domínio II em um ângulo perpendicular. Além disso a cristalografia revelou que a maior parte do contato de 2A10G6 com ZIKV-E ocorre em resíduos hidrofóbicos do *loop* de fusão, incluindo W101, L107 e F108. Esses resíduos são altamente conservados em todas as cepas de ZIKV isoladas de pacientes infectados. De acordo com os experimentos realizados, o anticorpo monoclonal 2A10G6 se confirmou uma boa alternativa para neutralização e consequentemente para ser usado em terapia.

FIGURA 21 – ATIVIDADE NEUTRALIZANTE E PROTETIVA DO ANTICORPO MONOCLONAL 2A10G6 CONTRA ZIKV.



LEGENDA: A- ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DE 2A10G6 PARA ZIKV AVALIADOS POR ENSAIO DE REDUÇÃO DE PLACAS EM CELULAS BHK21. B – ATIVIDADE TERAPÊUTICA DE 2A10G6 EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM ZIKV. A INOCULAÇÃO DE UMA ÚNICA DOSE DE 2A10G6 24H APÓS A INFECÇÃO RESULTOU EM 100% DE SOBREVIVÊNCIA.

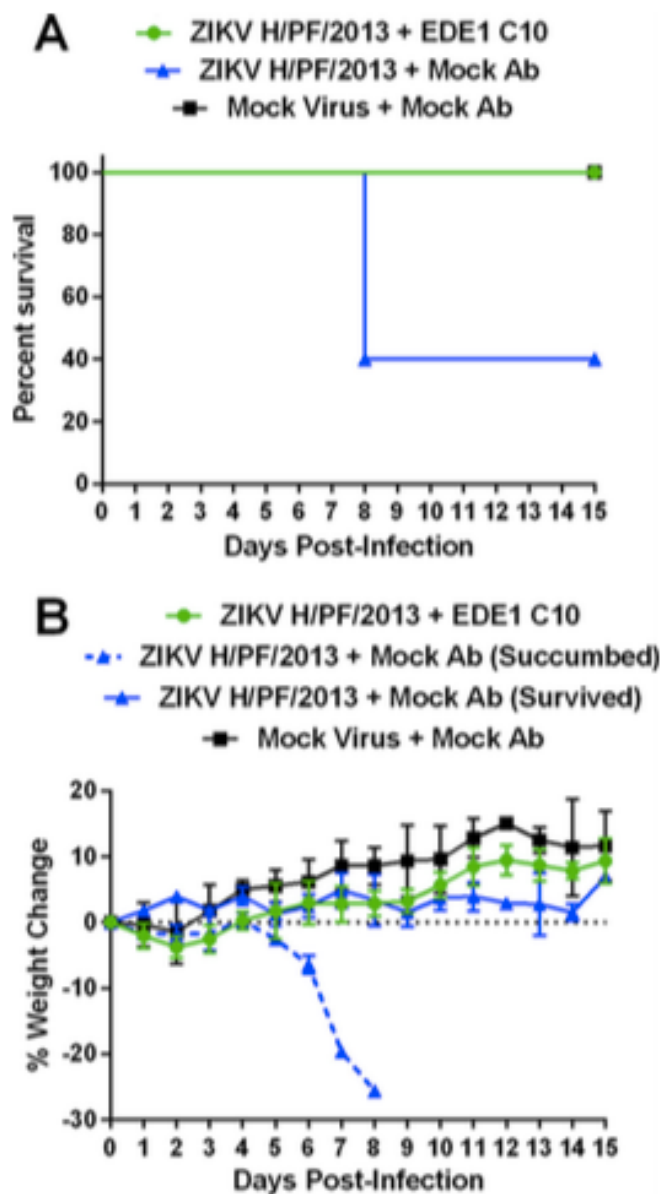
FONTE: (DAI ET AL., 2016)

O estudo realizado por Barba-Spaeth et al. (2016) também identificou anticorpos que reconhecem o *loop* de fusão da proteína de envelope do ZIKV. Assim como o grupo de Dai (2016), Barba-Spaeth utilizou o anticorpo monoclonal EDE1 C10 previamente desenvolvido contra DENV para testar a sua capacidade neutralizante contra o vírus Zika. O estudo identificou o potencial de EDE1 C10 para ser usado em profilaxia, devido a sua capacidade neutralizante *in vitro* para ZIKV.

Dando continuidade ao estudo do anticorpo EDE1 C10, o grupo de Swanstrom (2016) e Zhang (2016) e colaboradores realizaram estudos *in vitro* e *in vivo*. Para o estudo *in vivo* os camundongos foram tratados com o anticorpo EDE1 C10 e após um dia foram inoculados com a cepa de ZIKV H/PF/2013. Os animais nos quais foi feita a profilaxia com o anticorpo tiveram 100% de sobrevivencia. Além disso, eles não apresentaram sinais de doença, como perda de peso (Figura 22).

Como será discutido no próximo tópico, alguns anticorpos com reação cruzada para flavivírus podem causar maiores complicações em uma infecção por DENV ou ZIKV. Com o intuito de evitar esses problemas, o grupo formado por Dai et al. (2016) juntamente com Wang (2016) desenvolveu um painel de anticorpos neutralizantes específicos para ZIKV, sendo mais promissores os anticorpos Z20, Z23 e Z3L1. A eficácia de proteção dos anticorpos Z20, Z23 e Z3L1 foi avaliada em modelos *in vivo*. Os camundongos foram inoculados com ZIKV e após um dia foi administrada uma única dose dos anticorpos. Animais tratados com Z23 ou Z3L1 ficaram completamente protegidos contra a infecção por ZIKV. Além da atividade terapêutica, o grupo também identificou os epítomos de neutralização de cada anticorpo na proteína de envelope de ZIKV. O anticorpo Z20 devido às suas diferenças na ligação com o *loop* de fusão de ZIKV-E mostrou um grande potencial de afinidade/neutralização para ZIKV. Além disso, esse anticorpo se liga a ZIKV-E na forma de dímero e não permite que haja a mudança conformacional para trímero, prevenindo a fusão com a membrana e posterior entrada na célula hospedeira.

FIGURA 22 – PROTEÇÃO CONTRA ZIKA EM CAMUNDONTOS PELO TRATAMENTO COM O ANTICORPO MONOCLONAL EDE1 C10

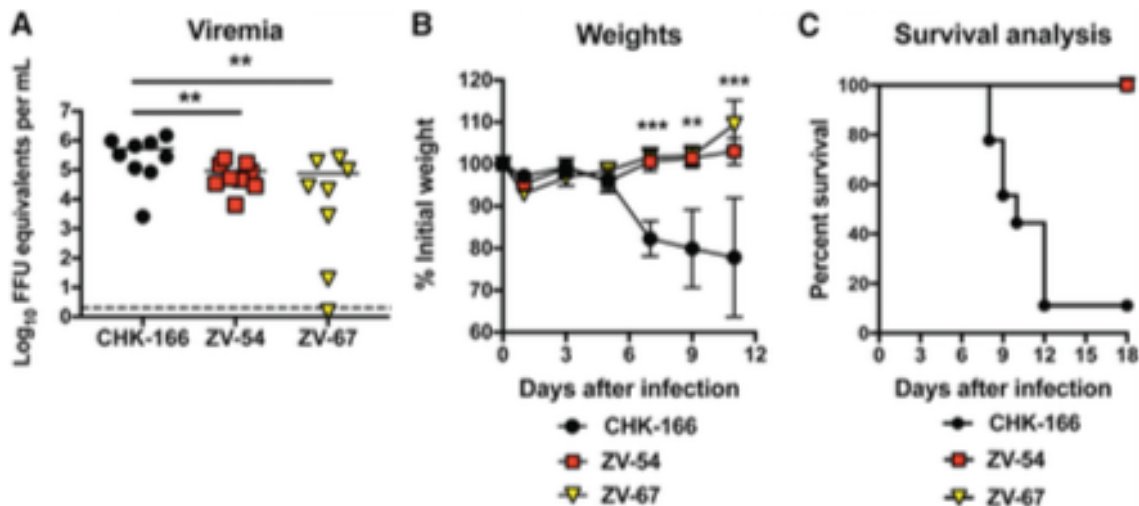


LEGENDA: FORAM UTILIZADOS CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA RECEPTORES DE INTERFERON TIPO I/II. OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM UMA DOSE ÚNICA DE EDE1 C10 OU PBS (MOCK) E ENTÃO INOCULADOS COM ZIKV. A – SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS; B – PERDA DE PESO.

FONTE: Adaptado de Zhang et al. (2016)

Novos anticorpos neutralizantes (ZV-48,ZV-54,ZV-64 e ZV-67) que reconhecem o domínio III de ZIKV-E, foram desenvolvidos em 2016 pelo grupo de Zhao e colaboradores (2016). O desenvolvimento desses anticorpos foi por meio da geração de hibridomas, através da fusão de esplenócitos de camundongos imunizados com ZIKV e células de mieloma. Foram realizados testes de proteção *in vivo* nos quais camundongos inoculados com ZIKV receberam no dia anterior à infecção uma única dose de 250  $\mu$ g dos anticorpos ZV-54 e ZV-67. Como resultado, foi mostrado que esses anticorpos foram capazes de proteger os camundongos contra infecção fatal por ZIKV (Figura 23).

FIGURA 23 – PROTEÇÃO *IN VIVO* POR ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ZIKV



LEGENDA: CAMUNDONGOS C57BL/6 FORAM IMUNIZADOS COM OS ANTICORPOS ANTI-ZIKV Z-54, Z-67 OU COM O ANTICORPO CHK-166 (NÃO RELACIONADO A ZIKV), NO DIA ANTERIOR A INOCULAÇÃO COM ZIKV.

A – TRES DIAS APÓS A INFECÇÃO, FOI COLETADO O SORO DOS CAMUNDONGOS PARA QUANTIFICAR A PRESENÇA DE RNA VIRAL. B- FORAM MEDIDOS OS PESOS DOS CAMUNDONGOS DIARIAMENTE. C- FOI DETERMINADO O PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS. ZV-54 E ZV-67 PROTEGERAM OS CAMUNDONGOS CONTRA A INFECÇÃO DE ZIKV QUANDO COMPARADO COM O CONTROLE.

FONTE: (ZHAO et al., 2016)

Como foi possível observar, a maioria dos anticorpos neutralizantes reconhece algum epítopo presente da proteína de envelope do ZIKV. Provavelmente a eficácia da neutralização do vírus através da ligação dos anticorpos à proteína de envelope ocorre por bloquear as suas principais funções que são a ligação ao receptor da célula hospedeira e fusão de membranas.

A proteína de envelope possui três domínios distintos - DI, DII e DIII. O peptídeo de fusão está localizado na ponta do DII e está escondido pelos domínios DI e DIII. Estudos realizados com DENV mostraram que o DIII é um alvo importante para anticorpos neutralizantes (PRIYAMVADA et al., 2017). Além do reconhecimento do DIII, foram obtidos potentes anticorpos neutralizantes que reconhecem o *loop* de fusão da proteína E que anteriormente foi elucidado como um domínio potente para neutralização, no entanto com altas taxas de reação cruzada (DEJNIRATTISAI et al., 2014).

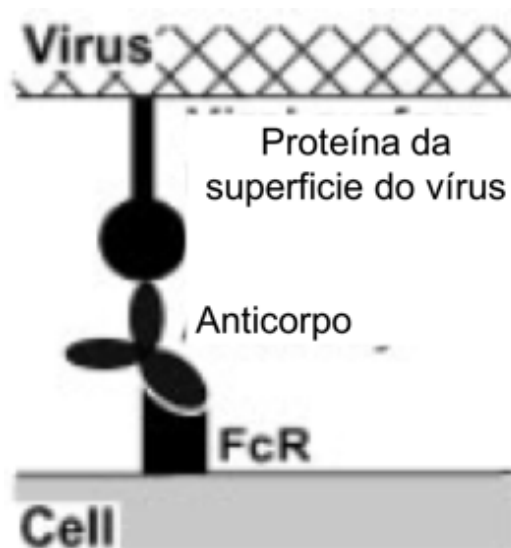
### 5.3 POTENCIALIZAÇÃO DEPENDENTE DE ANTICORPOS (*ANTIBODY DEPENDENTE ENHANCEMENT* - ADE) ENTRE DENV E ZIKV

O primeiro relato de potencialização dependente de anticorpos (ADE) para flavivírus foi feito por Hawkes e colaboradores (1964). O pesquisador descreveu que a infecção pelo vírus da encefalite de Murray Valley, do Oeste do Nilo e da encefalite Japonesa eram potencializadas em ensaios em células de fibroblasto de aves embrionárias na presença de soro de aves, mas não quando os ensaios eram realizados com células de rim de suínos. Mais tarde, foi descoberto que essa potencialização era devido à presença de anticorpos IgG específicos para outros vírus. A descrição de ADE na infecção por DENV foi realizada por Halstead e colaboradores (1977), na qual foi identificado o vírus nos leucócitos do sangue periférico de primatas, promovendo a primeira pista do mecanismo pelo qual ADE funciona. Desde então ADE vem sendo estudada intensivamente em flavivírus para elucidar a sua importância clínica.

A hipótese mais aceita para o mecanismo de ADE é que o complexo formado pelo vírus com anticorpos de uma infecção prévia pode se ligar a células portadoras do receptor FcR (geralmente encontrado em células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, células B) através da interação entre a porção Fc do anticorpo e o FcR na

superfície da célula, promovendo uma ponte que aumenta a ligação do vírus às células (Figura 24).

FIGURA 24 – INTERAÇÃO ENTRE ANTICORPO E O RECEPTOR CELULAR FcR



FONTE: TAKADA et al., 2003

Estudos demonstrando a existência de ADE na presença de um anticorpo pré-existente com reação cruzada são controversos. Em alguns casos, a existência desse anticorpos com reação cruzada demonstram potencialização de ADE; mas há estudos que mostram um potencial terapêutico desses anticorpos, o que poderia estar relacionado à dose do anticorpo (MUNJAL et al., 2017).

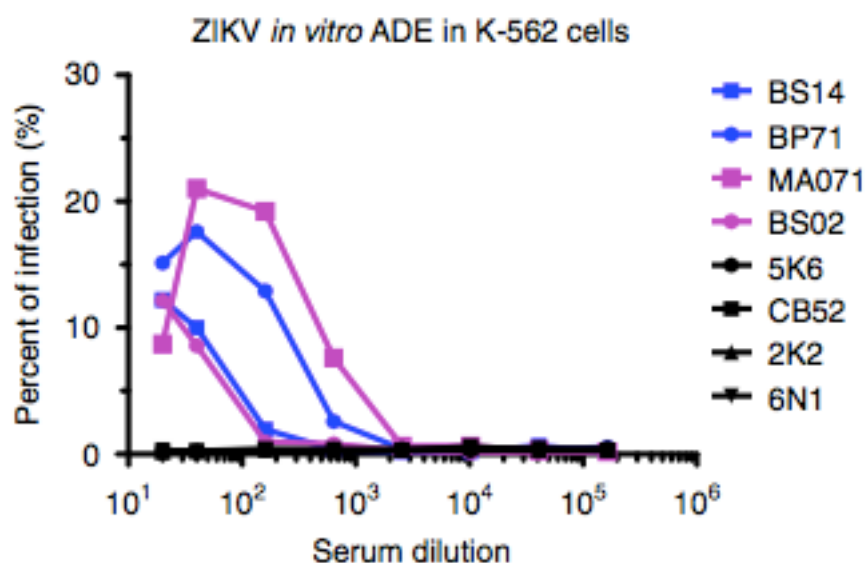
Os grupos de Paul et al. (2016), Dejnirattisai et al. (2016) e Priyamvada et al. (2016) realizaram ensaios para avaliar o potencial de anticorpos monoclonais anti-DENV causarem ADE em células infectadas por ZIKV. Células expressando o receptor FcR foram incubadas com soro de pacientes previamente infectados com DENV e com o ZIKV. Como resultado, os pesquisadores observaram um aumento da infecção por ZIKV na presença de anticorpos anti-DENV quando comparado ao grupo controle.

Posteriormente, esses resultados foram comprovados pelo grupo de Charles (2016), que usou o AcM 4G2 anti-flavivírus para demonstrar ADE em infecções de ZIKV.

O anticorpo anti-ZIKV (ZKA78) desenvolvido pelo grupo de Stettler et al. (2016) foi usado para determinar a sua capacidade de causar ADE em animais infectados com DENV. Quando ZKA78 foi administrado previamente à infecção por DENV 2, foi notada a potencialização da infecção causada por DENV e morte dos camundongos após o 5º dia de infecção, sugerindo que anticorpos anti-ZIKV também podem causar ADE em infecções por DENV. Além das interações entre anticorpos de DENV e ZIKV, o estudo realizado por Willis e colaboradores (2017) demonstrou através de ensaios *in vitro* que os anticorpos gerados da infecção pelo vírus do Oeste do Nilo (WNV) também podem causar ADE. Para determinar esse feito, o grupo avaliou a porcentagem de células K562 que estavam expressando a proteína E de ZIKV. Corroborando com esse resultado o grupo de Bardina (2017) obteve o mesmo resultado através de ensaios realizados *in vivo*.

Em oposição, o grupo de Pantoja e colaboradores (2017) descreveu ensaios em primatas não humanos que não identificaram ADE *in vivo*. Foram realizados ensaios *in vitro* que mostraram os mesmos efeitos de ADE obtidos em estudos anteriores (Figura 25), no entanto esse efeito não foi verificado *in vivo*. Quando foi inoculado ZIKV em macacos com infecção prévia de DENV, foi observada a redução do número de dias de viremia de ZIKV quando comparado com macacos não imunes a DENV. Esse resultado sugere que uma infecção prévia por DENV pode resultar em uma modulação da resposta imune e não a potencialização da doença.



FIGURA 25 –ADE DE ZIKV CAUSADA PELO SORO DE MACACOS IMUNES A DENV *IN VITRO*

LEGENDA – O SORO DE MACACOS IMUNES A DENV FOI INCUBADO COM A CEPA H/PF/2013 DE ZIKV. CÉLULAS K-562 FORAM ADICIONADAS E INCUBADAS POR 22 H. A PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFECTADAS FOI DETERMINADA POR CITOMETRIA DE FLUXO. COMO RESULTADO FOI ENCONTRADO QUE EM PRESENÇA DO SORO DO MACACO INFECTADO – LINHAS COLORIDAS – HÁ AUMENTO DA INFECÇÃO DAS CÉLULAS POR ZIKV QUANDO COMPARADO AO ENSAIO REALIZADO COM O SORO DE MACACOS NÃO IMUNES – LINHAS PRETAS.

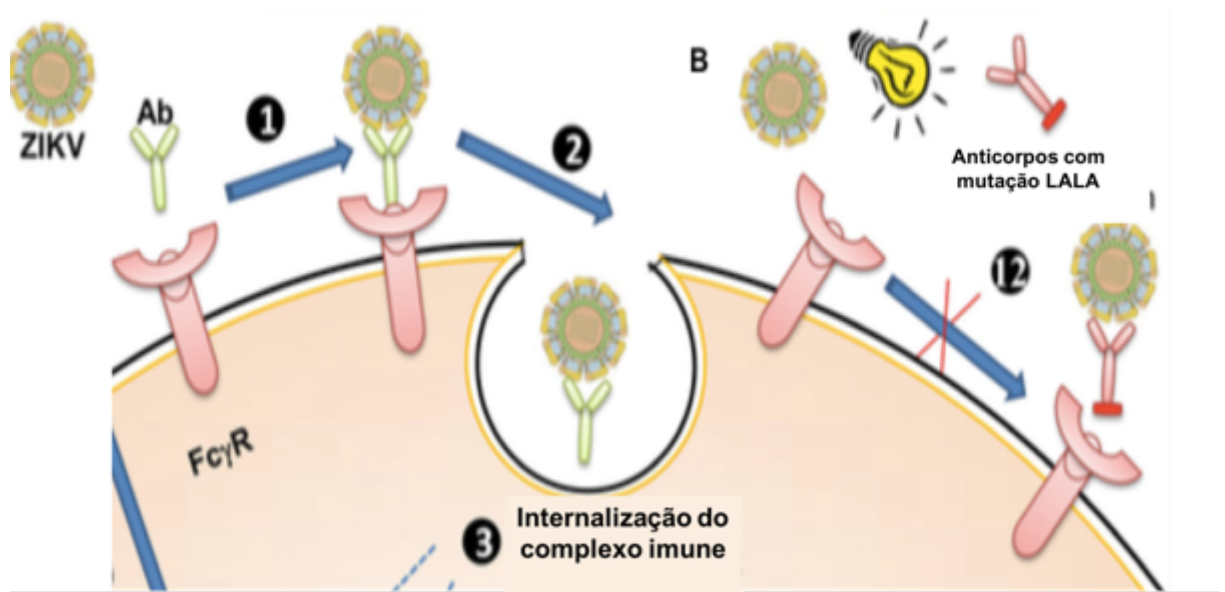
FONTE: PANTOJA et al., 2017

Como solução para os problemas causados por ADE de flavivírus, é possível desenvolver anticorpos LALA que sofrem mutações nas posições 234 e 235 de leucina (L) para alanina (A) na região Fc de anticorpos IgG. Esses anticorpos com mutação LALA são incapazes de interagir com o receptor FcR e assim são eliminadas as chances de causar ADE em interação com os flavivírus (Figura 26).

O anticorpo anti-ZIKV ZKA64 do grupo de Stettler et al. (2016) foi desenvolvido com mutação LALA com o propósito de ser usado em terapia na infecção por ZIKV. O anticorpo foi testado *in vivo* e, como resultado, ZKA64-LALA foi capaz de proteger completamente camundongos inoculados com uma dose letal de ZIKV quando o anticorpo foi administrado um dia antes ou depois da inoculação com ZIKV. Seguindo esse mesmo objetivo o grupo de Kam (2017) gerou o anticorpo anti-DENV SIgN-3C-LALA

com mutação LALA, o qual neutraliza ZIKV e não induz ADE. Esses resultados indicam o potencial desses anticorpos com a mutação LALA como uma alternativa mais segura para serem usados como terapia em área com co-circulação de diferentes flavivírus, prevenindo o efeito de ADE.

FIGURA 26 – POTENCIALIZAÇÃO DEPENDENTE DE ANTICORPO (ADE) NA INFECÇÃO POR ZIKV E ESTRATÉGIA DE MUTAÇÃO-LALA PARA LIMITAR ESTE EFEITO



LEGENDA – A) (1) RECEPTORES FCRS ESTÃO PRESENTES NA SUPERFÍCIE CELULAR DE CELULAS DO SISTEMA IMUNE. A LIGAÇÃO DO COMPLEXO ANTICORPO-VÍRUS AOS RECEPTORES FCR (2) RESULTA EM INTERNALIZAÇÃO DO COMPLEXO IMUNE NA CÉLULA (3). B) ANTICORPOS COM MUTAÇÃO LALA NA REGIÃO Fc SÃO CAPAZES DE NEUTRALIZAR O VÍRUS, NO ENTANTO NÃO SE LIGAM AO RECEPTOR FcR PREVENINDO A INTERNALIZAÇÃO DO COMPLEXO IMUNE E, CONSEQUENTEMENTE, ADE (12).

FONTE: (MUNJAL ET AL., 2017)

## 6 CONCLUSÕES

O vírus Zika compartilha muitas características com outros membros do gênero *Flavivirus*. Evidências recentes de transmissão vertical da mãe para o feto e o desenvolvimento de microcefalia alertam para a necessidade do desenvolvimento de um diagnóstico e tratamento eficientes para a infecção de ZIKV.

Anticorpos monoclonais específicos para ZIKV podem ser usados para tornar os testes sorológicos mais sensíveis e específicos. O uso de AcM para identificar a proteína NS1 do ZIKV no soro de pacientes infectados tem se mostrado uma ferramenta promissora para uso em teste diagnóstico. Além desse uso, os AcM também podem ser usados como controle nesses testes, o que pode ajudar a diferenciar resultados falso-positivos. Anticorpos monoclonais podem ser utilizados como uma ferramenta para a imunohistoquímica para identificar, por exemplo, a presença do vírus na placenta, permitindo a realização de um diagnóstico diferencial em casos suspeitos de infecção por ZIKV durante a gestação. Testes rápidos para serem utilizados em unidades de pronto atendimento poderiam facilitar a triagem dos pacientes.

A terapia como uma alternativa para neutralizar o ZIKV em pacientes infectados pode ser uma opção de tratamento para mulheres grávidas devido à capacidade de os anticorpos atravessarem a barreira placentária e, assim, fornecer proteção ao feto. Diversos anticorpos monoclonais específicos para ZIKV ou para *Flavivirus* foram desenvolvidos para fins terapêuticos. A ocorrência de potencialização da infecção dependente de anticorpos (ADE) em *Flavivirus* é um dos principais desafios para o uso desses anticorpos na terapia em regiões endêmicas para *Flavivirus*. Embora esse efeito ainda seja controverso, ele poderia ser reduzido ao se utilizar anticorpos com mutações LALA em aminoácidos da porção Fc dos anticorpos. Experimentos realizados comprovaram que essa mutação é capaz de bloquear a internalização dos complexos vírus-anticorpo nas células, prevenindo ADE. Os resultados preliminares no uso de anticorpos monoclonais específicos para ZIKV na terapia podem encorajar o estudo dos anticorpos ainda não avaliados para ADE ou a indução de mutações para impedir que a potencialização ocorra.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7th . 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; et al. Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. **Biochemistry and Molecular Biology Education**. v. 36, 2008.
- ASHKAR, A. A.; ROSENTHAL, K. L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. **Curr Mol Med**, v. 2, n. 6, p. 545–556, 2002.
- BALMASEDA, A.; STETTLER, K.; MEDIALDEA-CARRERA, R.; et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201704984, 2017.
- BARBA-SPAETH, G.; DEJNIRATTISAI, W.; ROUVINSKI, A.; et al. Erratum: Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 314–314, 2016.
- BARDINA, S. V.; BUNDUC, P.; TRIPATHI, S.; et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 175–180, 2017.
- BAZAN, J.; CAŁKOSIŃSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display - A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 8, n. 12, p. 1817–1828, 2012.
- BOSCH, I.; PUIG, H. DE; HILEY, M.; et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. **Science translational medicine**, p. 1–14, 2017.
- BROWN T, A. Introduction of DNA into Living Cells. **Gene Cloning & DNA Analysis: An Introduction** 2010.
- CHARLES, A. S.; CHRISTOFFERSON, R. C. Utility of a Dengue-Derived Monoclonal Antibody to Enhance Zika Infection In Vitro. **PLoS Currents**, v. 21, p. 1–9, 2016.
- CLETON, N. B.; GODEKE, G. J.; REIMERINK, J.; et al. Spot the Difference—

Development of a Syndrome Based Protein Microarray for Specific Serological Detection of Multiple Flavivirus Infections in Travelers. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.

CORTI, D.; LANZAVECCHIA, A. Efficient Methods To Isolate Human Monoclonal Antibodies from Memory B Cells and Plasma Cells. **Microbiology Spectrum**. 2017, p. 1–9, 2014.

CORTI, D.; VOSS, J.; GAMBLIN, S. J.; et al. A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins. **Science**, v. 333, n. 6044, 2011.

DAI, L.; SONG, J.; LU, X.; et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 2016.

DEJNIRATTISAI, W.; WONGWIWAT, W.; SUPASA, S.; et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. **Nature Immunology**, v. 16, n. 2, p. 170–177, 2014.

DENG, Y. Q.; DAI, J. X.; JI, G. H.; et al. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of e protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DOWD, K. A.; PIERSON, T. C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 306–315, 2011.

DUFFY M. CHEN T. HANCOCK T. POWERS A. KOOL J. LANCIOTTI R. PRETRICK M. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira**

**de Medicina Tropical**, 2007.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUL, p. 1–20, 2013.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Antibody enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. **Nature**, v. 265, p. 739–741, 1977.

HAWKES, R. A. Enhancement of the Infectivity of Arboviruses by Specific Antisera Produced in Domestic Fowls. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, 1964.

HUGGINS, J.; PELLEGRIN, T.; FELGAR, R. E.; et al. CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. **Blood**, v. 109, n. 4, p. 1611–1619, 2007.

HUGHES, B. W.; ADDANKI, K. C.; SRISKANDA, A. N.; MCLEAN, E.; BAGASRA, O. Infectivity of Immature Neurons to Zika Virus: A Link to Congenital Zika Syndrome. **EBioMedicine**, v. 10, p. 65–70, 2016.

HUZLY, D.; HANSELMANN, I.; PANNING, M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. , p. 1–4, 2016.

IOOS, S.; et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014. Elsevier Masson SAS.

KAM, Y.-W.; LEE, C. Y.-P.; TEO, T.-H.; et al. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. **JCI Insight**, v. 2, n. 8, p. 1–10, 2017.

KAWIECKI, A. B.; MAYTON, E. H.; DUTUZE, M. F.; et al. Tissue tropisms, infection kinetics, histologic lesions, and antibody response of the MR766 strain of Zika virus in a murine model. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 82, 2017.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 1975.

KÜGLER, J.; ZANTOW, J.; MEYER, T.; HUST, M. Oligopeptide M13 phage display in pathogen research. **Viruses**, 2013.

KUNIHOLM, M. H.; WOLFE, N. D.; HUANG, C. Y. H.; et al. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 1078–1083, 2006.

KUROSAKI, T.; KOMETANI, K.; ISE, W. Memory B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 149–159, 2015.

KWAKKENBOS, M. J.; DIEHL, S. A.; YASUDA, E.; et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. **Nature medicine**, v. 16, n. 1, p. 123–8, 2010. LANDRY, M. L.; GEORGE, K. S. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. **Arch Pathol Lab Med**, v. 141, n. January, 2017.

LANZAVECCHIA, A.; CORTI, D.; SALLUSTO, F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 523–528, 2007.

LIU, J. K. H. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 3, n. 4, p. 113–116, 2014.

MEULEN, J. TER. Monoclonal antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 12, n. 4, p. 525–540, 2007.

MINER, J. J.; CAO, B.; GOVERO, J.; et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise Article Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA E RESPOSTA À OCORRÊNCIA DE MICROCEFALIA E/OU ALTERAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC). **2016 Ministério da Saúde.**, 2016.

MUNJAL, A.; KHANDIA, R.; DHAMA, K.; SACHAN, S. Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus : Current Knowledge and Future Perspectives. , v. 8, n. August, p.

1–19, 2017.

NORONHA, L. DE; ZANLUCA, C.; LUIZE, M.; et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. May, p. 287–293, 2016.

OSHEROVICH, L. Making mAbs en masse. **Science-Business eXchange**, v. 3, n. 2, p. 1–3, 2010.

RAY, D.; SHI, P.-Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 1, n. 1, p. 45–55, 2006. PANTOJA, P.; PÉREZ-GUZMÁN, E. X.; RODRÍGUEZ, I. V.; et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nature Communications**, v. 8, p. 15674, 2017.

PAUL, L. M.; CARLIN, E. R.; JENKINS, M. M.; et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 12, p. e117, 2016.

PRIMROSE, S. .; TWYMAN, R. . Principles of Gene Manipulation and Genomics 7th Edition. **Blackwell Publishing**, 2006.

PRIYAMVADA, L.; HUDSON, W.; AHMED, R.; WRAMMERT, J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 5, p. e33, 2017.

PRIYAMVADA, L.; QUICKE, K. M.; HUDSON, W. H.; et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 28, p. 7852–7, 2016.

SANTOS, N. O. .; ROMANOS, M. T. .; WIGG, M. . **Introdução à virologia humana**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

SAPPARAPU, G.; FERNANDEZ, E.; KOSE, N.; et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 443–447, 2016.

SCHIRRMANN, T.; MEYER, T.; SCH??TTE, M.; FRENZEL, A.; HUST, M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy.



**Molecules**, v. 16, n. 1, p. 412–426, 2011.

SCHROEDER, H. W. J.; CAVACINI, L. Structure and Function of Immunoglobulins (author manuscript). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S41–S52, 2010.

SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278–287, 2012.

STEINHAGEN, K.; PROBST, C.; RADZIMSKI, C.; et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies : a multicohort study of assay performance. **Euro Surveill** , 2015 to 2016. , p. 1–16, 2016.

STETTLER, K.; BELTRAMELLO, M.; ESPINOSA, D. A.; et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. , v. 353, n. 6301, 2016.

SWANSTROM, J. A.; PLANTE, J. A.; PLANTE, K. S.; et al. Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–8, 2016.

TAKADA, A.; KAWAOKA, Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: Molecular mechanisms and in vivo implications. **Reviews in Medical Virology**, 2003.

THERMO SCIENTIFIC. ELISA technical guide and protocols. **Thermo Scientific**, v. 65, n. 815, p. 1–14, 2010.

TRAGGIAI, E.; BECKER, S.; SUBBARAO, K.; et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. **Nature medicine**, v. 10, n. 8, p. 871–875, 2004.

WANG, Q.; YANG, H.; LIU, X.; et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 369, p. 369ra179-369ra179, 2016.

WARD, P. A. ET AL. **Monoclonal Antibody Production**. Washington, DC, 1998.

WILLIS, E.; HENSLEY, S. E. Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies. **Virology**, v. 508, n. April, p. 1–6, 2017.

YANG, K.; SCIENCE, M.; CAROLINA, N. Analytical methods for detection of Zika virus. , **MRS Communications** v. 7, n. 2, p. 121–130, 2017.

YOCKEY, L. J.; VARELA, L.; RAKIB, T.; et al. Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1247–1256.e4, 2016.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. DE; MOSIMANN, A. L. P.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHANG, S.; KOSTYUCHENKO, V. A.; NG, T.-S.; et al. Neutralization mechanism of a highly potent antibody against Zika virus. **Nature Communications**, v. 7, p. 13679, 2016.

ZHAO, H.; FERNANDEZ, E.; DOWD, K. A.; et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Article Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 1016–1027, 2016.

## APÊNDICE 1

### 1. TABELA CONTENDO A LITERATURA SELECIONADA

Título	Autor	Ano	Uso dos anticorpos			
			ZIKV	Terapia	Diagnóstico	ADE
Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection	Paul <i>et al.</i>	2016	x			x
Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus	Dejnirattisai <i>et al.</i>	2016	x			x
Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus	Priyamvada <i>et al.</i>	2016	x			x
Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus	Wang <i>et al.</i>	2016	x	x		
Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice	Sapparapu <i>et al.</i>	2016	x	x		
Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection	Stettin <i>et al.</i>	2016	x	x		x
Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization	Barba-Spaeth <i>et al.</i>	2016	x	x		
Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody	Dai <i>et al.</i>	2016	x	x		
Utility of a Dengue-Derived Monoclonal Antibody to Enhance Zika Infection In Vitro	Charles <i>et al.</i>	2016	x			x
Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus	Swanstrom <i>et al.</i>	2016	x	x		
Neutralization mechanism of a highly potent antibody against Zika virus	Zhang <i>et al.</i>	2016	x	x		
Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection	Zhao <i>et al.</i>	2016	x	x		
Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016	Steinhagen <i>et al.</i>	2016	x		x	
A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection	Hasan <i>et al.</i>	2017	x	x		
A human inferred germline antibody binds to an immunodominant epitope and neutralizes Zika virus	Magnani <i>et al.</i>	2017	x	x		

A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis	Goo <i>et al.</i>	2017	x			
Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies	Willis <i>et al.</i>	2017	x			x
Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections	Kam <i>et al.</i>	2017	x	x		x
Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity	Bardina <i>et al.</i>	2017	X			x
Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology - REVISAO	Priyamvada <i>et al.</i>	2017	x	x		X
Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies Against Zika Virus from Dengue Virus Infection	Collins <i>et al.</i>	2017	x			x
Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection	Yu <i>et al.</i>	2017	x		x	
Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection	Landry <i>et al.</i>	2017	x		x	
Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses	Balmaseda <i>et al.</i>	2017	x		x	
Analytical methods for detection of Zika virus	Yang <i>et al.</i>	2017	x		x	
Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure	Andrade <i>et al.</i>	2017	x			x
Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives	Munjal <i>et al.</i>	2017	x			x
Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus	Pantoja <i>et al.</i>	2017	x			x

## APÊNDICE 2

### 2. RESUMO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS PARA ZIKV OU FLAVIVIRUS MAIS PROMISSORES DISCUTIDOS NA REVISÃO

AcM	Referência	Reatividade	Epítopo	USO	ADE <sup>a</sup>	Eficiência <sup>b</sup>
<b>2A10G6</b>	Deng <i>et al.</i>	anti-Flavivírus	Loop de fusão E	Terapêutico	-	x
<b>Anti-NS1 ZKA35</b>	Balmaseda <i>et al.</i>		NS1	NS1 BOB ELISA	-	
<b>ZIKV-117</b>	Sapparapu <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DII	Terapêutico	-	x
<b>EDE1 C10</b>	Barba-apaeth <i>et al.</i>	anti -Flavivírus	Loop de fusão E	Terapêutico	-	x
<b>Z20</b>	Dai e Wang <i>et al.</i>	anti -ZIKV	Loop de fusão E	Terapêutico	-	x
<b>Z23</b>	Dai e Wang <i>et al.</i>	anti -ZIKV	Loop de fusão E	Terapêutico	-	x
<b>Z3L1</b>	Dai e Wang <i>et al.</i>	anti -ZIKV	Loop de fusão E	Terapêutico	-	x
<b>ZV-48</b>	Zhao <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DIII	Terapêutico	-	x
<b>ZV-54</b>	Zhao <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DIII	Terapêutico	-	x
<b>ZV-64</b>	Zhao <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DIII	Terapêutico	-	x
<b>ZV-67</b>	Zhao <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DIII	Terapêutico	-	x
<b>ZKA78</b>	Stettler <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DIII	Terapêutico	Positivo	
<b>ZKA64 - LALA</b>	Stettler <i>et al.</i>	anti -ZIKV	DIII	Terapêutico	Negativo	x
<b>SlgN-3C- LALA</b>	Kam <i>et al.</i>	anti -Flavivírus	Loop de fusão E	Terapêutico	Negativo	x

<sup>a</sup> (-) Não foram realizados testes de ADE

<sup>b</sup> (X) Resultado positivo para eficiência